



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Uclédia Roberta Alberto dos Santos

**Respostas bioquímicas de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas formuladas
com *Ulva ohnoi* e *Lactobacillus plantarum***

Florianópolis-SC

2022

Ucléda Roberta Alberto dos Santos

Respostas bioquímicas de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas formuladas com *Ulva ohnoi* e *Lactobacillus plantarum*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de mestre em Aquicultura.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Risoleta Freire Marques
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliana Righetto Moser

Florianópolis-SC

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Uclédia Roberta Alberto dos
Respostas bioquímicas de *Litopenaeus vannamei*
alimentados com dietas formuladas com *Ulva ohnoi* e
Lactobacillus plantarum / Uclédia Roberta Alberto dos
Santos ; orientadora, Maria Risoleta Freire Marques,
coorientador, Juliana Righetto Moser, 2022.
75 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. *Litopenaeus vannamei*. 3. *Ulva ohnoi*.
4. Aditivos alimentares. 5. Estresse térmico. I. Marques,
Maria Risoleta Freire . II. Moser, Juliana Righetto . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Uclélia Roberta Alberto dos Santos

**Respostas bioquímicas de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas formuladas
com *Ulva ohnoi* e *Lactobacillus plantarum***

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Maria Risoleta Freire Marques, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a. Isabel Cristina Muller, Dr.^a.
Instituto Federal Catarinense

Prof. Carlos Peres Silva, Dr
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Mestre em Aquicultura

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.^a. Maria Risoleta Freire Marques, Dr.^a.
Orientadora

Florianópolis, 2022

Dedico este trabalho aos meus amados pais. Minha mãe Maria do Socorro e meu pai Paulo Sérgio, que se orgulham a cada pequenino passo que dou. ♡

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus, meu primeiro amor que permite a minha existência e a de pessoas que amo e que fazem toda a diferença em minha vida.

Agradeço aos meus pais: Maria do Socorro e Paulo Sérgio, por todo o carinho, incentivo e apoio incondicional. Vocês são as luzes da minha vida.

Ao meu querido Benedito Ferreira, meu outro pai, por toda a assistência prestada e carinho.

Aos meus amados e loucos irmãos e irmãs. Vocês são minha fonte de alegria e claro, são os pais dos meu adorados sobrinhos e sobrinhas.

Agradeço ao meu namorado William Lima por todos os momentos de conversa e compreensão e que não mede esforços para cuidar de mim.

Aos amigos que tenho desde o pré-escolar: Ruti Souza, Daniela Miranda, Jonathan Lima e Lana Prata. Vocês são as minhas fontes de risadas incontroláveis.

Aos amigos que encontrei durante a caminhada acadêmica, Alcindo Junior, Lourival Almeida (Bené), Camila Matos, e Claudiana Castilho.

Agradeço também a minha amiga e irmã Gracienhe Gomes, dona dos adjetivos mais lindos que existem. Entramos no mestrado juntas, passamos por momentos de extrema alegria e de companheirismo.

Aos amigos que a pós-graduação me presenteou: Hugo Moreira, Domickson Costa, Arthur Ramos e Denis Piteira. Vocês são os melhores! Ao Ailton Ribeiro, o amigo que me faz rir até nos momentos mais improváveis.

À Jaqueline, por toda parceria durante o experimento. Obrigada pelos dias, pelas conversas e conselhos.

Ao professor Felipe do Nascimento Vieira que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho; e a todos os colaboradores do LCM, sempre disponíveis a ajudar.

À minha orientadora e mãe científica, Maria Risoleta Freire Marques. Obrigada! Levarei todos os ensinamentos na mente e no coração. Sou imensamente grata por todos os conselhos, pelo carinho acolhedor, atenção e cuidado. Riso, muitíssimo obrigada e essas palavras aqui não são nada perto de toda gratidão que tenho e sinto por você.

À minha coorientadora Juliana Moser, que foi minha mãe, irmã e amiga. Ju, só Deus sabe como eu sou grata por ter lhe conhecido e por tê-la em minha caminhada. Você estará para sempre no meu coração. Obrigada por me orientar, pelos puxões de orelha, por me incentivar e compreender. Ainda farei você sentir orgulho de mim.

À minha querida e atenciosa psicóloga Larissa Lindervinde, que me acompanhou durante os momentos mais difíceis desta caminhada, me ajudando a levantar, a caminhar, me ouvindo... obrigada, Lari!

Ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica – LABCAI e ao grupo de pesquisa que o compõe. Em especial, gostaria de agradecer ao Gabriel Soares, irmão científico, Thiago Vinter pelas instruções iniciais, à Júlia Martim e Geovana pelas conversas e auxílio durante a coleta, ao Gabriel Coutinho por sempre estar disposto a me ajudar; ao Jacó Mattos, que consegue solucionar até o “insolucionável”. À Camila Lisarb pelo apoio prestado, à Vera Helena, sempre muito gentil, à Bárbara Righetti que me auxiliou em alguns testes, ao Clei Piazza e a Daína de Lima por falarem para eu manter a tranquilidade e por me fazer lembrar que no fim tudo dá certo. Ao Miguel Saldaña por toda a disponibilidade, explicações e auxílio na bancada. Ao Diego Nogueira (o chefe) que conheci no final do mestrado, e que sem dúvidas foi um presente enviado por Deus, pois a presença dele torna tudo mais alegre.

Ao professor Dr. Afonso Celso Dias Bainy, pelo apoio ao longo do estudo realizado no LABCAI.

A todos os servidores do NEPAq.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. Em especial a professora Leila Hayashi, professor Maurício Laterça e ao secretário Carlito sempre atento às demandas dos estudantes.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A aquicultura é uma atividade produtiva do setor de alimentos que vem apresentando rápido crescimento e expansão mundial. Na aquicultura, a suplementação alimentar com macroalgas e probióticos tem gerado interesse nos últimos anos, como estratégia para promover o crescimento animal, e a redução do uso de quimioterápicos nos cultivos. Nesse estudo foi avaliado o efeito da macroalga *Ulva ohnoi*, isoladamente, e em conjunto com o probiótico *Lactobacillus plantarum*, no desempenho zootécnico, no índice de condição fisiológica, na peroxidação lipídica e na resistência ao choque térmico a baixa temperatura em *Litopenaeus vannamei*, mantidos em água clara. Camarões (n=560), distribuídos em dezesseis unidades experimentais (n=35/tanque), foram alimentados (quatro vezes por dia) ao longo de quarenta e cinco dias com uma dieta controle (sem aditivos), ou com dietas suplementadas com 2% da biomassa seca da alga e/ou com o probiótico na concentração de $1,7 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ por grama de ração. A biometria foi realizada semanalmente para o acompanhamento zootécnico. Ao final do período de alimentação, os grupos das diferentes dietas foram submetidos a estresse térmico por baixa temperatura ($11,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ por 1 hora), sendo, em seguida, transferidos para tanques com a temperatura de cultivo utilizada previamente ($28 \pm 0,6^\circ\text{C}$). Ao final do período de alimentação, os grupos alimentados com os aditivos alga, probiótico, e alga + probiótico (A + P) apresentaram sobrevivência de 99 %, 98 %, e 98 %, respectivamente, enquanto para o grupo controle foi observado 96 % de sobrevivência. Por outro lado, após o estresse térmico, a maior sobrevivência (77,5 %) foi observada para o grupo da dieta alga, enquanto a menor (62,5 %) foi observada no grupo controle. Entre os parâmetros zootécnicos, somente o peso final mostrou diferença estatística no grupo alimentado com a dieta contendo o aditivo probiótico em relação ao grupo controle. Os valores do índice de condição fisiológica no hepatopâncreas foram significativamente diferentes entre os grupos, sendo os maiores índices obtidos nos grupos que receberam a dieta contendo alga. Após o estresse térmico, os índices de condição fisiológica avaliados no hepatopâncreas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Por outro lado, os resultados de peroxidação lipídica indicaram diferenças significativas, sendo os maiores níveis detectados entre os grupos alimentados com a dieta alga. A análise comparativa entre camarões positivos e negativos para o vírus IHNV não indicou efeito da infecção natural sobre os parâmetros analisados, independentemente das dietas. Assim sendo, este trabalho, o primeiro trabalho a avaliar parâmetros bioquímicos em *L. vannamei* frente às dietas contendo *U. ohnoi* como aditivo alimentar, apontou que a inclusão dessa espécie de alga na dieta fornecida aos camarões, durante seis semanas de cultivo, teve um efeito positivo contra o estresse térmico por baixa temperatura e em relação ao índice de condição fisiológica no hepatopâncreas. Entretanto, foi observada uma diferença significativa nos níveis de peroxidação lipídica no grupo alimentado com a dieta alga combinada com o probiótico (A+P). Assim sendo, a realização de novos estudos é sugerida para ampliar a avaliação da aplicabilidade dessa espécie de alga como aditivo alimentar no setor aquícola, em particular na carcinicultura.

Palavras-chave: Aquicultura. *Litopenaeus vannamei*. *Ulva ohnoi*. Aditivos alimentares. Estresse térmico.

ABSTRACT

Aquaculture is a productive activity of the food sector that has been showing rapid growth and expansion worldwide. Since food additives have emerged as an important strategy in aquaculture practices in the recent years, this study aimed to evaluate the effect of the macroalgae *Ulva ohnoi*, either isolated or combined with the probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum*, on the zootechnical performance, resistance to cold stress and biochemical responses (physiological condition index and lipid peroxidation) in *Litopenaeus vannamei*, kept in clear water. Shrimp (n=560), distributed in sixteen tanks (n=35/tank), were fed (four times a day) for forty-five days with a control diet (no additives) or with diets containing the same ingredients of the control diet, plus 2% of algae dry biomass and/or with the probiotic bacterium ($1,7 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ per feed gram). Shrimp biometry was performed weekly for zootechnical monitoring. At the end of the feeding period, the groups fed with the different diets were subjected to low temperature stress (at 11.5 °C for 1 hour), and then transferred to tanks with water kept at the same previous maintenance temperature (28 ± 0.6 °C). The survival rates for the groups fed with algae, probiotic, and algae + probiotic (A + P), were 99 %, 98 % and 98 %, respectively, while 96 % of survival was observed for the control group. After cold stress, the highest survival rate (77.5%) was observed for the group fed with algae, whereas the control group showed 62.5% of survival. No differences were seen among the zootechnical parameters, except for the final weight in the group fed with the probiotic bacterium. The physiological condition index in the hepatopancreas showed significant difference among groups and the highest values were found for the groups fed with diets containing algae. On the other hand, after the low temperature stress, no significant differences were seen among groups. The results related to hepatopancreas lipid peroxidation showed significant differences among groups and the most elevated levels were found for the groups fed with algae. The comparative analysis between IHHNV positive and negative shrimp showed no effect of the natural infection by this pathogen on the studied parameters, independent of the type of diet (control or diet with additives). Therefore, the present work, a pioneer investigation aimed to evaluate biochemical parameters in *L. vannamei* fed with diets containing *U. ohnoi* as feed additive, showed a positive effect of the inclusion of this algae species against thermal stress caused by low temperature and towards the physiological condition index in hepatopancreas. However, a significant difference was seen in the levels of lipid peroxidation in the group fed with the algae diet combined with the probiotic (A+P). Future studies are suggested to broaden and further evaluate the use of this algae as feed additive in aquaculture, especially in shrimp aquaculture.

Keywords: Aquaculture. *Litopenaeus vannamei*. *Ulva ohnoi*. Feed additives. Thermal stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Exemplar juvenil de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. 15
- Figura 2** - Estrutura do principal dissacarídeo de repetição em *Ulva* sp., ulvana: ácido ulvanobiurônico..... 24
- Figura 3** - A) Macroalga do gênero *Ulva* sp. B) Células vegetais de *Ulva ohnoi* com destaque para os cloroplastos. 25
- Figura 4** - Rações experimentais. A) Ração controle (sem aditivos). B) Ração formulada com biomassa seca de *Ulva ohnoi*..... 34
- Figura 5** - Ganho de peso semanal (g) de camarões alimentados com diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca de *Ulva ohnoi*), probiótico (ração controle + *Lactobacillus plantarum*), alga + probiótico (ração biomassa seca de *U. ohnoi* + *L. plantarum*). 41
- Figura 6** - Peso final de camarões alimentados durante 45 dias com as dietas experimentais: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*). 42
- Figura 7** - Sobrevivência final do *Litopenaeus vannamei* após 45 dias de cultivo em sistema de cultivo de água clara e alimentados diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*). ... 42
- Figura 8** - Sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* submetidos a estresse térmico. Camarões alimentados durante 45 dias com diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*). ... 43
- Figura 9** - Detecção de IHHNV em amostras de hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas. Gel de agarose a 2% representativo dos produtos amplificados por PCR, após eletroforese e coloração com GelRed®. M: marcador de peso molecular (100 pb), C +: controle positivo, C -: controle negativo, amostra 2: IHHNV não detectado, amostras 1 – 8: detecção de IHHNV. Fragmento da região alvo do genoma do vírus correspondente a 512 pb..... 44
- Figura 10** - Índice de condição fisiológica (razão RNA/DNA) de *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*). Letras diferentes indicam diferença significativa, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). 45

- Figura 11** - Índice de condição fisiológica (razão RNA/DNA) de *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*) submetido a estresse térmico ao final de 45 dias de cultivo. 46
- Figura 12** - Índice de condição fisiológica (razão RNA/DNA) considerando a presença ou ausência do vírus IHHNV em *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas durante 45 dias. Detectado: D, Não detectado: ND. IHHNV detectado: controle: n = 2; alga: n = 6; probiótico: n = 4; alga + probiótico: n = 5. IHHNV não detectado: controle: n = 8; alga: n = 4; probiótico: n = 4; alga + probiótico n = 3. 46
- Figura 13** - Índice de condição fisiológica (razão RNA/DNA) considerando a presença ou ausência de IHHNV em *Litopenaeus vannamei* submetidos ao estresse térmico. Detectado: D, Não detectado: ND. IHHNV detectado: controle n = 7; alga: n = 10, probiótico: n = 8; alga + probiótico: n = 8. IHHNV não detectado: controle: n = 3; alga: n = 0; probiótico: n = 2; alga + probiótico: n=2. 47
- Figura 14** - Quantificação do produto final da peroxidação lipídica (MDA) em hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$)..... 48
- Figura 15** - Quantificação do produto da peroxidação lipídica em hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*) submetidos a estresse térmico. 48
- Figura 16** - Quantificação do produto final da peroxidação lipídica considerando a presença ou ausência de IHHNV em *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas ao longo de 45 dias. Detectado: D, Não detectado: ND. IHHNV detectado: controle n = 6; alga: n = 5, probiótico: n = 5; alga + probiótico: n = 8. IHHNV não detectado: controle: n = 4; alga n = 5; probiótico: n = 5; alga + probiótico: n = 2. 48
- Figura 17** - Quantificação do produto final da peroxidação lipídica considerando presença ou ausência de IHHNV em *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas ao longo de 45 dias e submetidos a estresse térmico. Detectado: D, Não detectado: ND IHHNV detectado: controle n = 7; alga: n = 6, probiótico: n = 9; alga + probiótico: n = 8. IHHNV não detectado: controle: n = 3; alga: = 4; probiótico: n = 1; alga + probiótico: n = 2..... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulação e composição centesimal da ração utilizada.	35
Tabela 2 - Painel de iniciadores utilizados para detecção de patógenos (IHHNV e WSSV) relacionados à infecção natural.	37
Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos de qualidade de água ao longo do tratamento com dietas experimentais (ao longo de 45 dias de cultivo).	40
Tabela 4 - Presença do vírus IHHNV em <i>Litopenaeus vannamei</i> após 45 dias de cultivo, nos grupos alimentados com quatro dietas distintas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga <i>Ulva ohnoi</i>), probiótico (dieta controle + <i>Lactobacillus plantarum</i>) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: <i>U. ohnoi</i> + <i>L. plantarum</i>) (n=20 camarões/grupo), e presença do vírus IHHNV em <i>L. vannamei</i> após 45 dias de cultivo recebendo diferentes dietas e submetidos a estresse térmico (n=20 camarões/grupo).	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	CARCINICULTURA	14
1.2	DOENÇAS PRESENTES NA CARCINICULTURA.....	17
1.3	SISTEMAS MOLECULARES DE DEFESA: SISTEMA IMUNOLÓGICO E DEFESAS ANTIOXIDANTES	18
1.4	ALIMENTAÇÃO: PROBIÓTICOS E MACROALGAS.....	21
1.5	BIOMARCADORES	25
1.6	OBJETIVOS	27
1.6.1	Objetivo geral	27
1.6.2	Objetivos específicos	27
1.7	ESTRUTURA DO TRABALHO.....	28
2	ARTIGO CIENTÍFICO	29
2.1	INTRODUÇÃO	31
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	32
2.2.1	Material biológico	32
2.2.2	Delineamento experimental	33
2.2.3	Preparo das dietas experimentais	33
2.2.4	Obtenção dos parâmetros zootécnicos	35
2.2.5	Estresse térmico	36
2.2.5.1	Temperatura letal	36
2.2.5.2	Estresse térmico	36
2.2.6	Coleta de tecidos	36
2.2.7	Extração de DNA	37
2.2.8	Screening para os vírus IHNV e WSSV: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	37
2.2.9	Índice de condição fisiológica (RNA/DNA)	38
2.2.10	Peroxidação lipídica	38
2.2.11	Análise estatística	39
2.3	RESULTADOS.....	39
2.3.1	Qualidade da água do cultivo	39
2.3.2	Dados zootécnicos	40
2.3.2.1	Dietas experimentais	40

2.3.3	Estresse térmico.....	42
2.3.4	Avaliação da presença prévia de patógenos virais (ocorrência de infecção natural).....	43
2.3.5	Índice de condição fisiológica.....	44
2.3.5.1	Dietas experimentais: razão RNA/DNA	44
2.3.5.2	Estresse térmico: razão RNA/DNA	45
2.3.6	Índice de condição fisiológica x IHHNV	46
2.3.6.1	Dietas experimentais	46
2.3.6.2	Estresse térmico	47
2.3.7	Peroxidação lipídica.....	47
2.3.7.1	Dietas experimentais	47
2.3.7.2	Estresse térmico	47
2.3.8	Peroxidação lipídica x IHHNV	48
2.3.8.1	Dietas experimentais	48
2.3.8.2	Estresse térmico	49
2.4	DISCUSSÃO	49
2.5	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS.....	60
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINICULTURA

A aquicultura tem sido considerada uma das atividades econômicas mais promissoras das últimas décadas, contribuindo fortemente para a balança comercial de muitos países. O relatório da produção aquícola e pesqueira de 2020 da *Food and Agriculture Organization of United Nations* (FAO) revelou que a produção global da aquicultura atingiu um recorde de 122,6 milhões de toneladas, sendo animais aquáticos os responsáveis por 87.5 milhões de toneladas e algas por 35.1 milhões de toneladas (FAO, 2022).

Ao nível das espécies, com 5,8 milhões de toneladas, o *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) foi o camarão mais produzido em 2020, dominando a produção global de camarões (FAO, 2022). Os dados indicam que a espécie *L. vannamei*, conhecida como o camarão branco do pacífico, representa 51,7 % da produção mundial e dentro do grupo dos crustáceos responde pela expressiva produção com 5.812, 2 milhões de toneladas em 2020 (FAO, 2022).

Considerado uma *commodity*, o *L. vannamei* é um crustáceo dominante na aquicultura costeira mundial e uma importante fonte de ganhos de exportação para os países em desenvolvimento na Ásia e América Latina (KLONKLAEW et al., 2020; FAO, 2022). Valentim-Neto (2011) contribui alegando que a aquicultura de camarões peneídeos é uma indústria importante nas Américas, estando baseada quase que inteiramente sobre o cultivo da espécie *L. vannamei*. Em contrapartida, o crescimento constante da aquicultura tem sido ameaçado por doenças emergentes com efeitos prejudiciais sobre a produtividade (PINOARGOTE et al., 2018), além dos desafios representados por questões biológicas, ambientais e socioeconômicas (LAZADO; CAIPANG; ESTANTE, 2015). FAO (2022) faz um alerta sobre a intensificação da aquicultura e a globalização do comércio de produtos aquáticos, enfatizando que doenças infecciosas emergentes e reemergentes representam um desafio econômico e ambiental para a sociedade.

Nativo da costa do Pacífico Oriental do México e do Norte do Peru, o *L. vannamei* cultivado no Brasil, já ocupou posições de destaque no cenário mundial da carcinicultura (NATORI et al., 2011; SANTOS et al., 2013; SCHLEDER, 2017). A espécie foi introduzida no Brasil na década de 80 devido aos problemas de adaptação das espécies nativas para criação em cativeiro, e considerando o potencial do Brasil para o cultivo de camarões, devido às suas características climáticas, hidrológicas e topográficas favoráveis (SPELTA, 2016).

A espécie *L. vannamei* (figura 1) apresenta características zootécnicas favoráveis ao cultivo, dentre as quais, o rápido crescimento associado à conversão alimentar, a rusticidade,

uma vez que este crustáceo é considerado tolerante às variações de salinidade e ambientes com elevadas densidades de estocagem, alta taxa de sobrevivência, além de um pacote tecnológico já estabelecido pela indústria do camarão. Segundo Moser (2005), o cultivo de camarão marinho como atividade produtiva do setor primário da economia, tem reflexos imediatos no mercado de trabalho pela sua ampla capacidade de gerar empregos diretos e indiretos.

Figura 1 - Exemplar juvenil de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.



Fonte: Registro da autora.

De acordo com Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), em conjunto com Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2003, o cultivo de camarões do Brasil bateu um recorde de produção ao ultrapassar 90 mil toneladas, das quais quase 80% destinaram-se ao mercado internacional, com um valor de exportação da ordem de 226 milhões de dólares (ABCC/MAPA, 2017). A carcinicultura nacional continua lutando contra os empecilhos que recorrentemente a desafiam e, apesar das intempéries, mostrou que de 2004 a 2015 foi capaz de manter uma produção média de 73 mil toneladas (ABCC/MAPA, 2017).

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revelam que em 2020 a produção de camarão criado em cativeiro foi de 63,1 mil toneladas, chegando a atingir a cifra de R\$1.3 milhão (IBGE, 2022). A região Nordeste ganha destaque no cenário nacional da carcinicultura, pois os maiores números de produção são oriundos dos estados de Sergipe e do Rio Grande do Norte, que respondem por 86,65 % e 80,89 %, respectivamente (IBGE, 2022).

No entanto, ao final de 2004, ano do primeiro relato da presença do vírus síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus* - WSSV) no Brasil, a carcinicultura nacional foi marcada por perdas significativas de lotes inteiros, pois o vírus se alastrou nas principais regiões produtoras do país (MAPA, 2019; SOUZA et al., 2019). Dentre as regiões produtoras, a região Sul, especialmente o estado de Santa Catarina, sofreu grande impacto em decorrência do surto causado pelo patógeno causador da mancha branca. De acordo com Nunes; Feijó (2016), as taxas de mortalidade chegaram a 90%, causando perdas econômicas de aproximadamente US\$ 3 milhões em Laguna (principal região produtora de Santa Catarina). A doença levou a uma redução na produção de camarão de 4.189 t em 2004 para 480 t em 2006. Dados recentes do IBGE (2022) indicam que, a região Sul do país produziu em 2020 cerca de 154.129 quilogramas de camarões, o que corresponde a 0,21 % da produção nacional de camarão de cativeiro (IBGE, 2022).

Schleder et al. (2020) afirmam que a doença da mancha branca, causada pelo WSSV, se tornou a maior ameaça à carcinicultura desde que surgiu no início da década de 1990, afetando todos os principais países produtores de camarão. Souza Valente et al. (2020) enfatizam a problemática das doenças infecciosas, como sendo um fator limitante para o avanço da aquicultura, e com a intensificação deste setor, somado ao tráfego entre países e às correntes oceânicas, os microrganismos patogênicos podem propagar-se rapidamente, causando impactos econômicos como alta taxa de mortalidade ou redução na comercialização.

Apesar de Bonami (2008) destacar que o rápido progresso na virologia de camarões naquele momento, após duas décadas, e a perspectiva de novos avanços, poder ser claramente relacionado ao alto valor comercial dos crustáceos cultivados, vemos, por outro lado, como também já destacava o mesmo autor, que as doenças de etiologia viral permanecem como um grande problema para a carcinicultura, e que os impactos econômicos e socioeconômicos têm sido severos, indicando que a relevância dos estudos relacionados a vírus patogênicos para crustáceos permanece. Ananda Raja et al. (2017) reforçam, como muitos autores, que manter o estado de saúde dos animais e a sanidade dos cultivos é um dos critérios mais importantes para a produção de camarão, no sentido de minimizar as perdas econômicas.

Schleder et al. (2017) destacam o Sul do Brasil como uma região na qual a carcinicultura foi fortemente afetada por surtos de doenças virais, levando a perdas massivas de produção. De acordo com os autores, algumas características dessa região, como o clima bastante instável e a alta flutuação de temperatura durante a safra, desempenham um papel importante como um gatilho natural facilitador de surtos de doenças. De acordo com Schleder

et al. (2020), o estresse térmico, particularmente aquele causado por baixas temperaturas, representa um importante fator para o surgimento de enfermidades em camarões cultivados.

Costa Rezende et al. (2021) ressaltam que o estresse causado pela temperatura pode reduzir a osmolaridade da hemolinfa, causando sérios danos ao hepatopâncreas de *L. vannamei* e reduzindo sua resposta imunológica. Os mesmos autores enfatizam que o estresse térmico pode também modificar o metabolismo energético, a coordenação neuromuscular e a proporção de ácidos graxos saturados e insaturados na membrana celular, comprometendo a permeabilidade e fluidez da membrana das células, causando desnaturação de proteínas e ocorrência de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS), seguidas de peroxidação lipídica e dano ao ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid* - DNA).

A variação rigorosa da temperatura do ambiente perturba a homeostase fisiológica e leva o animal ao comprometimento do sistema de defesa imunológico e antioxidante (XU et al., 2021). Xu et al. (2021) apontam que o hepatopâncreas é um órgão multifuncional dos crustáceos e, estressores ambientais severos podem lesar a estrutura celular desse tecido, conseqüentemente, perturbando a homeostase do sistema de regulação imune e antioxidante e eventualmente induzindo a mortalidade.

1.2 DOENÇAS PRESENTES NA CARCINICULTURA

Fisiologicamente ou ambientalmente estressados, os animais ficam mais facilmente predispostos a doenças infecciosas (ANANDA RAJA et al., 2017). Deste modo, os efeitos devastadores na indústria de peneídeos estão intimamente ligados a surtos de doenças devido a infecções virais e bacterianas, as quais podem ser associadas a condições ambientais que acabam por contribuir para uma maior susceptibilidade a esses agentes patogênicos (KUMAR et al., 2014; PINOARGOTE et al., 2018; SOUZA VALENTE et al., 2020). Os ambientes aquáticos são ricos em nutrientes orgânicos e inorgânicos e criam uma comunidade microbiana densa e diversificada, incluindo procariontes, protozoários, fungos e uma ampla variedade de vírus envelopados e não envelopados. Estes microrganismos são facilmente dispersos pela água e podem interagir com todos os organismos multicelulares em relações simbióticas ou patogênicas (SILVEIRA et al., 2018; SOUZA VALENTE et al., 2020).

Crustáceos são infectados por contato direto com animais infectados (canibalismo), através de água contaminada ou por transmissão vertical (SOUZA VALENTE et al., 2020). Várias doenças causadas por vírus e bactérias já foram relatadas e reconhecidas como potencialmente prejudiciais ao meio ambiente por apresentar alta taxa de contaminação a outros organismos, assim como, desencadear surtos em lotes inteiros de cultivo e dizimar a população

mantida em confinamento em questão de dias. De acordo com Bonami (2008), as condições de cultivo da população de camarões podem, facilmente, exceder 300.000 pós-larvas por hectare onde um surto de doença, associada a mortalidade em massa pode ser desastrosa.

As principais doenças que acometem os crustáceos são listadas por meio da Portaria MPA nº 19/2015. O documento destaca as enfermidades de notificação obrigatória presentes na carcinicultura, sendo destacadas elas aquelas causadas pelos seguintes agentes etiológicos: vírus da mionecrose infecciosa (*Infectious Myonecrosis virus* - IMNV), vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (*Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis virus* - IHHNV), vírus da síndrome da mancha branca (*White Spot Syndrome virus* - WSSV) e vírus da síndrome de Taura (*Taura Syndrome virus* - TSV), sendo esta última não registrada no Brasil (MAPA, 2021).

De acordo com Bonami (2008), além dos outros problemas relacionados à produção de crustáceos, o comércio de reprodutores e pós-larvas ocorre comumente sem a verificação de patógenos conhecidos e, deste modo, essa prática é responsável pela rápida disseminação mundial, por exemplo, do IHHNV, a introdução do TSV no Hemisfério Oriental e a rápida disseminação do WSSV do Hemisfério Oriental para o Ocidental. Como o WSSV e o IHHNV são alguns dos vírus mais importantes que afetam a carcinicultura mundial, pesquisas são necessárias para encontrar uma maneira de neutralizar o impacto desses vírus, como por exemplo, a utilização de agentes capazes de atuar no sistema imune dos animais (LEYVA-MADRIGAL et al., 2011).

1.3 SISTEMAS MOLECULARES DE DEFESA: SISTEMA IMUNOLÓGICO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

Apesar dos invertebrados não apresentarem imunidade adaptativa, as repostas integrantes da imunidade inata têm papel importante como principal meio de defesa à entrada e propagação de agentes patogênicos. A constante ativação do sistema imune não é desejável e é energeticamente custosa para os invertebrados. As respostas de defesa associadas à imunidade inata podem ser divididas em defesa humoral e defesa celular, capazes de reconhecer entre o próprio e não-próprio, através de uma série de proteínas de reconhecimento de padrões (PRPs) (AMPARYUP; CHAROENSAPSRI; TASSANAKAJON, 2013; JEARAPHUNT et al., 2015).

Os invertebrados contam ainda com barreiras físicas como primeira linha de proteção (WANG et al., 2012b; AMPARYUP; CHAROENSAPSRI; TASSANAKAJON, 2013), as quais, a cutícula rígida, as glândulas tegumentares e o intestino, sendo este último dividido em anterior, médio e posterior, são descritos como meios eficazes contra a aderência e penetração

de patógenos (LAVINE; STRAND, 2002; JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006; AMPARYUP; CHAROENSAPSRI; TASSANAKAJON, 2013; MCGAW; CURTIS, 2013; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Em relação ao intestino, estudos relacionados com a proteção que este órgão confere aos crustáceos peneídeos, como o camarão branco do Pacífico, mostraram a presença de uma membrana peritrófica, acelular e que reveste o intestino médio como observado em outros artrópodes, como os insetos, a qual serve como uma barreira entre o conteúdo do lúmen intestinal e o epitélio do intestino médio, protegendo esta porção de partículas abrasivas de alimentos e patógenos (WANG et al., 2012b).

No caso do rompimento de tais barreiras físicas e da conseqüente entrada de patógenos no corpo do animal, ocorre então a ativação de respostas celulares e humorais desencadeadas pelo sistema imune inato (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006), as quais funcionam, de forma sinérgica para proteger o animal e eliminar as partículas estranhas e patógenos (AMPARYUP; CHAROENSAPSRI; TASSANAKAJON, 2013).

As respostas celulares de defesa ocorrem através da ação de hemócitos, que são células imunocompetentes e que são classificadas em hemócitos hialinos, granulares e semi-granulares (BATTISTELLA; BONIVENTO; AMIRANTE, 1996). Jiravanichpaisal; Lee; Söderhäll (2006) relatam que estes componentes participam da depuração de patógenos, através de fagocitose, formação de nódulos, encapsulamento, dentre outros processos, contribuindo diretamente na eliminação de microrganismos ou partículas estranhas. Por sua vez, as respostas associadas com a fração humoral são diversas e envolvem a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), espécies reativas de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs), e a complexa cascata enzimática que regula a coagulação ou a melanização da hemolinfa (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006).

Durante a eliminação de patógenos, várias reações são desencadeadas e acompanhadas pela produção de agentes que, em altas quantidades, podem causar danos aos animais. A fagocitose, por exemplo, produz e libera moléculas altamente tóxicas, que auxiliam na ruptura e na degradação do agente invasor. Neste processo, há um aumento significativo no consumo de oxigênio intracelular (choque respiratório ou estresse oxidativo), resultando na produção de uma variedade de radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (EROs) (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

Dantas et al. (2009) destacam que, quando os patógenos penetram na hemolinfa, são englobados pelos hemócitos e geram uma série de agentes antimicrobianos, tais como o ânion superóxido (O_2^*), o radical hidroxila (OH^*), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ocorrendo desta forma um “*burst*” respiratório (ou explosão respiratória, como também é chamado o choque

respiratório). Segundo Castex et al. (2010), todos os organismos vivos estão sob constante ataque de radicais livres, o que pode levar a danos celulares graves se produzidos em excesso.

Para se proteger contra os efeitos deletérios das EROs, as células contêm uma rede complexa de defesas antioxidantes, composta por antioxidantes não enzimáticos, como por exemplo, o peptídeo glutathiona (GSH), e enzimáticos, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (HALLIWELL, 2007; PAITAL, 2018). Esta última gera glutathiona oxidada (GSSG) que é reduzida pela ação das enzimas auxiliares glutathiona redutase (GR) e glicose 6 fosfato-desidrogenase (G6PDH) que fornece NADPH para a reciclagem de glutathiona reduzida (GSH) (SERRANO, 2014). De acordo com Castex et al. (2010), o sistema antioxidante integrado é reconhecido como um componente essencial de auto manutenção da homeostase de um organismo, destacando também a escassez de investigações experimentais relacionadas com a alteração do sistema de defesa antioxidante animal quando em estado de patogenicidade.

Além do complexo de defesa antioxidantes, os organismos aquáticos ainda contam com uma série de proteínas atuantes contra patógenos, dentre elas destacam-se a proteína apoptótica *QM*, que participa na defesa imunológica dos organismos sob ataque, uma vez que são capazes de reconhecer agentes externos, além de ser a proteína chave no processo de ativação do sistema profenoloxidase (*proPO*) (LIU; TSENG; CHENG, 2007; MÜLLER, 2009; MOSER, 2011). A proteína ferritina, que é considerada um elemento importante no sistema imunológico inato, apresenta regulação positiva após o desafio de patógenos (MOSER, 2011; YE et al., 2015).

Por outro lado, um papel como mediadoras das respostas moleculares de defesa do hospedeiro tem sido associado às histonas (HOEKSEMA et al., 2016), sendo que o gene *H2B* se mostrou induzido em camarões infectados naturalmente pelo WSSV (MÜLLER, 2009). Outra proteína associada à inibição de patógeno, como o WSSV em *L. vannamei*, é a proteína de choque térmico (*heat shock proteins* - HSP), em especial a HSP70 (JANEWANTHANAKUL et al., 2020; VALENTIM-NETO et al., 2014). Walker et al. (2011) apontam os fatores abióticos, tal como a temperatura, como sendo o fator controlador mais proeminente do metabolismo em *L. vannamei*, e respostas de peneídeos frente ao estresse por temperatura pode ser observada através da expressão dessa proteína de choque térmico.

De acordo com Janewanthanakul, et al. (2020), animais aquáticos estão constantemente expostos a ambientes de estresse como: estresse térmico, oxidativo, exposições tóxicas e infecções, que resultam na indução da expressão do gene HSP. Essa proteína integra uma família de proteínas que apresentam alto grau de homologia, cuja expressão e síntese é

entendida como parte da resposta celular a estresse físico e/ou químico (VALENTIM-NETO et al., 2014), e comumente estão associadas ao início e duração da tolerância à temperatura (CASTRO et al., 2014).

A supra regulação dos genes HSP em um curto período é um dos mecanismos protetores que confere proteção às células diante de alterações de processos bioquímicos, alterações fisiológicas e histológicas (JANEWANTHANAKUL et al., 2020). As HSPs também estão envolvidas no sistema imunológico, incluindo via apoptótica, processo inflamatório, estabelecendo imunidade associada a tumor em células apresentadoras de antígenos. De forma particular, a HSP70, de acordo com Valentim-Neto et al. (2014), pode ser considerada como um bom biomarcador de mudanças na atividade metabólica celular e de alerta do sistema imunológico na presença de um patógeno em *L.vannamei*, como no caso do WSSV.

Assim, a primeira resposta de um organismo a qualquer estresse ambiental, incluindo a infecção por patógenos, acontece bioquimicamente, a qual subjaz todos os efeitos de maior nível organizacional (CASTRO, et al., 2013; MOSER; VALENTIM-NETO, 2020). De acordo com Anaya-Rosas et al. (2019), as características dos camarões peneídeos, relacionadas ao seu sistema de defesa são as peças-chave para a viabilidade do uso de compostos que auxiliam a estimular o sistema imunológico no combate à doenças.

1.4 ALIMENTAÇÃO: PROBIÓTICOS E MACROALGAS

A alimentação pode influenciar a homeostase de invertebrados aquáticos marinhos, particularmente peneídeos, quando nela estão presentes, por exemplo, agentes antagonistas e inibidores enzimáticos, podendo ainda influenciar o equilíbrio da microbiota intestinal (HOLT et al., 2020). Em concordância com Bardera et al. (2019) há uma falta geral de informações do comportamento alimentar do indivíduo e os aspectos que podem ser importantes para determinar a eficiência alimentar ideal em camarões *Litopenaeus vannamei*, bem como em outras espécies comercialmente importantes.

Holt et al. (2020) enfatizam que micróbios que habitam o intestino são reconhecidos como importantes condutores de vários processos metabólicos no hospedeiro, enquanto Souza Valente et al. (2020) apontam para a importância da microbiota intestinal na homeostase em *L. vannamei* e para sua modulação frente a infecção viral. Assim sendo, a caracterização e a manipulação subsequente desta comunidade microscópica são propostas atraentes de pesquisas em aquicultura. Deste modo, vários estudos com suplementação alimentar para *L. vannamei* estão sendo realizados, pois além de conferir ações imunomodulatórias, essa suplementação pode atuar no desempenho zootécnico dos camarões (CASTEX et al., 2010; ZHENG et al.,

2017; DU et al., 2019; XIE et al., 2019). Recentemente, dietas com inserção de bactérias potencialmente benéficas (MELGAR VALDES et al., 2013; VIEIRA et al., 2016; KUMAR; SURESH BABU; ROY, 2018; WANG et al., 2019a) e extratos de algas têm sido comumente empregadas na aquicultura (SANTOS-JUNIOR et al., 2016; ANAYA ROSAS et al., 2017; SCHLEDER et al., 2018; KWON et al., 2019), pois são alternativas viáveis para reduzir ou neutralizar as perdas neste setor, podendo ainda reduzir custos de produção.

De acordo com Bolívar-Ramírez et al. (2021), os probióticos são amplamente reconhecidos na produção aquícola por aumentar a taxa de crescimento, melhorar a digestão e fornecer fatores nutricionais ao hospedeiro. Trabalhos com dietas suplementadas com os probióticos *Lactobacillus* spp., (VIEIRA et al., 2008; ZHENG et al., 2017; DU et al., 2019; XIE et al., 2019) e *Bacillus* spp., (DANTAS et al., 2009; XIE et al., 2019; ZOKAEIFAR et al., 2012) indicam que há melhora frequente na taxa de crescimento, aumento da taxa de sobrevivência, aumento da imunidade inespecífica, além de reduzir a presença de patógenos. Bolívar-Ramírez et al. (2021) destacam que bactérias lácticas e *Bacillus* são as cepas bacterianas mais utilizadas na aquicultura. Akhter et al. (2015) mencionam ser viável a inclusão destes microrganismos nas dietas de camarões, transformando-os em agentes que contribuem para a defesa contra patógenos, além de impulsionar benefícios para o estado de saúde geral do animal.

Os probióticos são suplementos alimentares à base de microrganismos vivos capazes de colonizar, estabelecer-se e multiplicar-se no intestino do hospedeiro e promover o equilíbrio da microbiota com benefícios para o hospedeiro (MELLO et al., 2013). Na aquicultura, dietas suplementadas com probióticos também são utilizadas como alternativas ao uso de antibióticos (LAKSHMI; VISWANATH; SAI GOPAL, 2013) e quimioterápicos, os quais podem causar problemas econômicos, sanitários e ambientais (CORNÉLIO et al., 2013). Kesarcodi-Watson et al. (2008) relatam a utilização de forma descontrolada de agentes antimicrobianos utilizados na produção aquícola, tornando bactérias resistentes a antibióticos e, dessa maneira, trazendo impactos para além dos cultivos, ou seja, para meio ambiente e para a saúde humana.

Por outro lado, Klongklaew et al. (2020) apontam a importância do uso de substâncias naturais como estratégia alternativa ao uso de antibióticos, relatando ainda que nas últimas décadas a descoberta de metabólitos a partir de recursos marinhos, mostrando atividade biológica, aumentou significativamente. De acordo com Fernández-Díaz; Coste; Malta (2017) há um interesse crescente em encontrar novas fontes de produtos bioativos marinhos com propriedades imunoestimulantes com aplicações em aquicultura.

De acordo com Lordan; Ross; Stanton (2011), devido à sua biodiversidade, o ambiente marinho é um rico recurso natural de muitos compostos biologicamente ativos, como ácidos

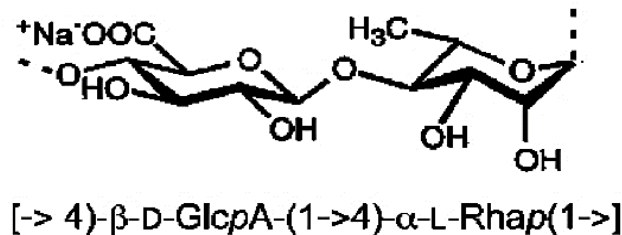
graxos poliinsaturados (PUFAs), esteróis, proteínas, polissacarídeos, antioxidantes e pigmentos. Entre os recursos marinhos, as algas são conhecidas como fontes naturais de polissacarídeos e lipídeos e, por possuírem diversos compostos bioativos, podem contribuir tanto como agentes imunoestimulantes, quanto antimicrobianos (CUNHA; GRENHA, 2016), além de ter sido descrito seu papel como agentes terapêuticos no controle de doenças causadas por *Vibrio* sp. em camarões (HINDU et al., 2019).

Anaya Rosas et al. (2017) ressaltam que as algas dos gêneros *Gracilaria* sp. e *Ulva* sp. são as mais estudadas na nutrição aquícola, na biorremediação de efluentes e imunoestimulação de camarão. De acordo Mangott et al. (2020), um grupo chave de algas marinhas com potencial para biorremediar a água e fornecer benefícios como ingrediente alimentar são as algas verdes do gênero *Ulva*. A ulvana é o principal polissacarídeo extraído da parede celular das algas da família *Ulva* sp. e representa cerca de 8-29% do peso seco destas algas, o que incentivou trabalhos recentes sobre polissacarídeos da parede celular de *Ulva* sp., em particular a ulvana, pois exhibe várias características físico-químicas e biológicas de potencial interesse para aplicações alimentícias, farmacêuticas, agrícolas e químicas (LAHAYE; ROBIC, 2007).

Lahaye; Robic (2007), ao realizarem uma revisão abrangente sobre a ulvana, destacaram a estrutura e algumas propriedades funcionais químicas e físico-químicas deste polissacarídeo (figura 2). A composição específica da ulvana varia extremamente. No entanto, verifica-se frequentemente a ocorrência dos monossacarídeos: ramnose, ácido glicurônico, glicose, ácido idurônico e xilose (FERNÁNDEZ-DÍAZ; COSTE; MALTA, 2017). A presença de uma grande quantidade de grupos metil (na unidade de repetição de ramnose) confere à ulvana, um certo caráter hidrofóbico, apesar da solubilidade aquosa do polissacarídeo, tendo sido observada a ocorrência de agregados esféricos de ulvana em solução aquosa (CUNHA; GRENHA, 2016).

Estudos a partir da utilização de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas indicam uma maior resistência aos indivíduos quando submetidos a condições de estresse, sugerindo um possível efeito imunoestimulante ao composto (LIMA et al., 2009). Desta forma, Aquino et al. (2005), destacam que os polissacarídeos sulfatados compreendem um grupo complexo de macromoléculas com uma ampla gama de importantes propriedades. Assim as bioatividades atribuídas a ulvana incluem atividade antioxidante, efeito antiviral ou, ainda, efeito imunomodulador (FERNÁNDEZ-DÍAZ; COSTE; MALTA, 2017).

Figura 2 - Estrutura do principal dissacarídeo de repetição em *Ulva* sp., ulvana: ácido ulvanobiurônico.



Fonte: Lahaye; Robic (2007).

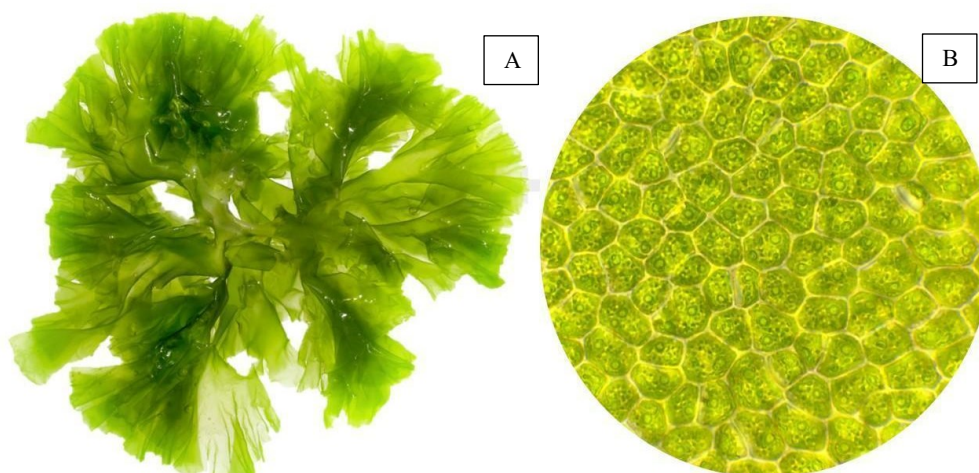
De acordo com Cruz-Suárez et al. (2008), a qualidade do exoesqueleto de camarão apresenta melhoria com o nível de *Ulva* sp. consumido, uma vez que, os lipídios diminuem, enquanto os carotenoides totais, astaxantina total e esterificada aumentam. Vizcaíno et al. (2019), afirmam que os estudos relacionados com as algas do gênero *Ulva* sp. tendem a se concentrar no desempenho de crescimento, taxa de sobrevivência, utilização de nutrientes, metabolismo intermediário, estado oxidativo, microbiota intestinal, histomorfologia intestinal, tolerância à hipóxia e características da qualidade da carne, geralmente de peixes.

A macroalga comumente chamada “alface do mar” *Ulva* sp., é tipicamente encontrada em climas temperados mais frios (como o Sul do Brasil), possui uma morfologia distinta das espécies 'filamentosas' e pode diferir das espécies encontrados em regiões tropicais mais quentes do Brasil (MCGOVERN, 2020) (figuras 3 A e 3 B), além disso, espécies da macroalga marinha verde *Ulva* spp. são muito comuns em áreas de mar raso em todo o mundo (KAZIR et al., 2019). Fernández-Díaz; Coste; Malta (2017) destacam a ulvana como um ativador de macrófago, e como um potencial ingrediente imunestimulante em alimentos para peixes marinhos.

Recentemente, pesquisas têm sido intensificadas sobre a utilização da macroalga *Ulva ohnoi* como aditivo alimentar na aquicultura (JONES; SMULLEN; CARTON, 2016; FERNÁNDEZ-DÍAZ; COSTE; MALTA, 2017; VIZCAÍNO et al., 2019; FUMANAL et al., 2020). *Ulva ohnoi* é uma macroalga verde com crescimento rápido, apresentando altas taxas de absorção de nitrogênio e fósforo, e é indicada com potencial efeito fitorremediador (BASTOS et al., 2019).

De acordo com Angell et al. (2015), as algas marinhas são uma fonte promissora de proteína sustentável com algumas vantagens sobre as culturas terrestres convencionais. O fortalecimento do sistema de defesa imunológico através da inserção de imunostimulantes como probióticos e algas marinhas em dietas alimentares é o método mais promissor de controle de doenças em animais aquáticos (NEWAJ-FYZUL; AUSTIN, 2015).

Figura 3 - A) Macroalga do gênero *Ulva* sp. B) Células vegetais de *Ulva ohnoi*.



Fonte: A) Compilação da autora (2022)¹. B) Adaptado de McGovern (2020).

1.5 BIOMARCADORES

Tu et al. (2010) afirmam que as alterações nutricionais produzidas pelo estresse, causadas, por exemplo, pela contaminação ambiental podem ter consequências críticas para a maior parte dos processos vitais. Assim sendo, biomarcadores são úteis como ferramentas de alerta precoce para efeitos potencialmente adversos do meio sobre os organismos. Para Dalzochio et al. (2016), os biomarcadores de efeito estão relacionados a alterações bioquímicas, fisiológicas ou outras mensuráveis, nos tecidos ou fluidos corporais de um organismo, as quais podem ser reconhecidas como associadas a um comprometimento, estabelecido ou possível, da saúde do organismo, ou mesmo uma doença.

Quando a produção de radicais livres anormal ou induzida por xenobióticos supera a proteção endógena proporcionada pelo conjunto das enzimas de defesa antioxidante, pelas vitaminas antioxidantes e outros sequestradores de radicais, o dano resultante aos constituintes celulares é conhecido coletivamente como estresse oxidativo (OAKES; VAN DER KRAAK, 2003). Almeida et al. (2003) apontam que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS) são continuamente geradas em sistemas biológicos como subprodutos do metabolismo oxidativo, e alguns dos efeitos deletérios desses radicais livres envolvem a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) das membranas celulares. Os níveis de tal dano são geralmente quantificados pela determinação do conteúdo tecidual de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DE SOUZA et al. 2014).

Análises envolvendo a peroxidação lipídica são aplicadas aos principais animais de interesse da aquicultura (mexilhões, ostras, peixes e camarões), não somente para detectar os

¹ Imagem licenciada por Euwxsybm de uso livre, coletada a partir do site: <https://www.subpng.com/png-5zmksa/>

danos causados pelo meio no qual o animal vive, mas também ao que o animal consome (ALMEIDA et al., 2003; SOUZA et al., 2014; ZACCHI et al., 2018; SIMIÃO et al., 2022). Deste modo, pesquisas adicionais devem ser realizadas para definir relações claras entre essas respostas de biomarcadores e a saúde de camarões em cultivo. Na aquicultura, além do uso de biomarcadores, outras ferramentas de análises e respostas precisas, principalmente, quanto ao crescimento e condições recentes (nas quais os animais foram recentemente submetidos) são cada vez mais utilizadas, tais como as relações obtidas através de ácidos nucleicos.

De acordo com Foley et al. (2016), enquanto muitas medidas tradicionais de crescimento e condição integram a história alimentar e a utilização energética nos diferentes estágios ontológicos de um organismo, as proporções de ácidos nucleicos (RNA/DNA) fornecem uma medida de crescimento e condição recentes, e deste modo apresentam vantagens potenciais sobre outras medidas. Atualmente, a abordagem geral e amplamente difundida para a quantificação das razões RNA/DNA envolve a medição fluorométrica das concentrações de ácido nucleico das amostras, antes e após a digestão com nucleases (RNase e/ou DNase) (GOROKHOVA, 2005; FOLEY et al., 2016; STERZELECKI et al., 2021a). Os índices derivados de ácidos nucleicos, especialmente a relação RNA/DNA, foram aplicados com sucesso como indicadores de estado nutricional, bem-estar e crescimento em organismos marinhos, como zooplâncton (GOROKHOVA, 2005; HÖÖK; GOROKHOVA; HANSSON, 2008), camarões (COSTA; YASUMARU; LEMOS, 2010; KIM et al., 2017; HUFNAGL; TEMMING, 2018), assim como para as larvas de peixes (HÖÖK; GOROKHOVA; HANSSON, 2008; ANGELO et al., 2021; STERZELECKI et al., 2021b).

De acordo com Chícharo; Chícharo (2008), a busca por índices confiáveis e precisos da condição nutricional e do crescimento de organismos, em particular organismos de cultivo, tem sido o foco de pesquisas e, que essas ferramentas bioquímicas têm sido o objeto dos desenvolvimentos mais recentes, baseando-se principalmente em determinação de índices de ácidos nucleicos. Tu et al. (2010) corroboram com as afirmações acima, ao reportarem que o uso da razão de ácidos nucleicos (RNA/DNA) tem sido sugerido para estimar o crescimento instantâneo e avaliar o estado nutricional de organismos aquáticos.

A razão RNA/DNA reflete variações nas taxas de síntese de proteínas (FARIA et al., 2011). Como o crescimento larval é dependente da síntese proteica, a relação RNA/DNA tem demonstrado alta sensibilidade aos níveis de alimentação, podendo ser usada como índice de crescimento dos peixes (GWAK et al., 2003). Para Faria et al. (2011), a quantidade de DNA em uma célula somática animal pode ser considerada normalmente estável, mas a quantidade

de RNA, principalmente associada aos ribossomos, está intimamente relacionada à taxa de síntese de proteínas.

Para Tu et al. (2010), a condição nutricional está associada ao suprimento alimentar e ao sucesso alimentar dos peixes e, portanto, a variabilidade no ambiente trófico se reflete na condição nutricional. Portanto, uma investigação da dinâmica fisiológica básica dos ácidos nucleicos durante estágios específicos da vida, ciclo de muda e em relação às condições ambientais é um pré-requisito para o uso deste método como marcadores bioquímicos de crescimento em estudos de campo e de laboratório (VARO et al., 2007; HEILMAYER et al., 2008; ANGELO et al., 2021; STERZELECKI et al., 2021a).

Deste modo, é notório que o principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura em nível mundial consiste atualmente no controle das infecções virais e bacterianas, além das flutuações físico-químicas da água (fator particularmente sensível em sistemas de cultivo) ambas condições intimamente ligadas, e, conseqüentemente, também considerados responsáveis pela ativação do sistema imune inato, agindo através de respostas humoral e celular, e de outras respostas de defesa, como aquelas envolvendo o sistema de defesa antioxidante. É sabido que a saúde do animal depende da qualidade de sua nutrição, deste modo, a aquicultura vêm buscando formular rações com inserção de imunoestimulantes e probióticos a fim de aumentar a resistência dos animais contra patógenos potencialmente devastadores.

Como forma de investigar as respostas moleculares ao estresse causado por agentes infecciosos e ambientais, assim como as respostas dos efeitos das dietas contendo aditivos alimentares, métodos precisos de avaliação do estado de saúde dos animais, tais como o uso de biomarcadores moleculares, aliado ao comportamento zootécnico, podem contribuir positivamente com o setor produtivo; contribuição essa que frente ao crescimento e intensificação da carcinicultura, pode se mostrar imprescindível para o avanço do setor.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de dietas formuladas com a macroalga *Ulva ohnoi* e o probiótico *Lactobacillus plantarum* sobre o desempenho zootécnico e respostas bioquímicas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

1.6.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o desempenho zootécnico de *Litopenaeus vannamei* frente às dietas formuladas durante 45 dias;

- b) Avaliar a relação do índice de condição fisiológica (relação RNA/DNA) no hepatopâncreas de *L. vannamei* alimentados com as dietas formuladas ao longo de 45 dias de cultivo;
- c) Avaliar a relação do índice de condição fisiológica (relação RNA/DNA) no hepatopâncreas de *L. vannamei* alimentados com as dietas formuladas e submetidos a estresse térmico;
- d) Avaliar o grau de peroxidação lipídica em hepatopâncreas de *L. vannamei* alimentados (ao longo de 45 dias) e submetidos a estresse térmico.
- e) Avaliar a influência de patógenos virais (IHHNV e WSSV) sobre as respostas bioquímicas analisadas (índice de condição fisiológica e peroxidação lipídica).

1.7 ESTRUTURA DO TRABALHO

A dissertação aqui apresentada está estruturada de acordo com as normas de formatação da revista “Aquaculture” (ISSN: 0044-8486).

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Respostas bioquímicas de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas formuladas com *Ulva ohnoi* e *Lactobacillus plantarum*

Uclé dia Roberta Alberto dos Santos¹; Jaqueline da Rosa Coelho²; Miguel Angel Saldaña Serrano¹; Felipe do Nascimento Vieira²; Juliana Righetto Moser¹; Maria Risoleta Freire Marques^{1*}

¹Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Aquicultura, Rodovia Admar Gonzaga 1346, 88037-000, Florianópolis, SC, Brasil

²Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

*Autor correspondente: Maria Risoleta Freire Marques (LABCAI) - Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Aquicultura, Rodovia Admar Gonzaga 1346, 88037-000, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: risoleta.marques@ufsc.br

RESUMO

Na aquicultura, a suplementação alimentar com macroalgas e probióticos tem gerado crescente interesse nos últimos anos, como estratégia para promover o crescimento animal, e a redução do uso de quimioterápicos nos cultivos. Nesse estudo foi avaliado o efeito da macroalga *Ulva ohnoi*, isoladamente, e em conjunto com o probiótico *Lactobacillus plantarum*, no desempenho zootécnico, no índice de condição fisiológico, na peroxidação lipídica e na resistência ao choque térmico a baixa temperatura em *Litopenaeus vannamei*, mantidos em água clara. Camarões (n=560), distribuídos em dezesseis unidades experimentais (n=35/tanque), foram alimentados (quatro vezes por dia) ao longo de quarenta e cinco dias com uma dieta controle (sem aditivos), e com dietas contendo os mesmos ingredientes da dieta controle, mas suplementadas com 2% da biomassa seca da alga e/ou com o probiótico na concentração de $1,7 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ por grama de ração. Ao final do período de alimentação, os grupos das diferentes dietas foram submetidos a estresse térmico por baixa temperatura ($11,5 \pm 0,1$ °C por 1 hora), sendo, em seguida, transferidos para tanques com água na mesma temperatura utilizada previamente ($28 \pm 0,6$ °C). Os grupos alimentados com alga (A), probiótico (P) e, alga + probiótico (A + P) apresentaram sobrevivência de 99 %, 98 % e 98 %, respectivamente, enquanto no grupo controle foi observada uma taxa de 96 % de sobrevivência. Para o estresse térmico, uma taxa de 77,5 % de sobrevivência foi observada para o grupo da dieta alga, e de 62,5 % para o grupo controle. Os dados obtidos do índice de condição fisiológica foram significativamente diferentes entre os grupos, sendo os maiores índices observados nos animais das dietas suplementadas com alga (A e A + P). Após o estresse térmico, os índices de condição fisiológica não apresentaram diferenças significativas. Os resultados de peroxidação lipídica indicaram diferenças significativas entre os grupos que foram alimentados com as diferentes dietas, tendo sido observado níveis mais elevados de malondialdeído (MDA) no grupo alimentado com a dieta combinada (A + P). A infecção natural pelo vírus IHHNV aparentemente não afetou os parâmetros avaliados, independentemente da dieta fornecida. Embora a adição desta macroalga, de forma isolada, e em conjunto com a bactéria ácido-láctica *Lactobacillus plantarum*, não tenha apresentado efeitos significativos no desempenho zootécnico, sua adição acarretou diferenças nos parâmetros bioquímicos avaliados e parece sugerir um potencial efeito positivo contra o estresse térmico.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*. *Ulva ohnoi*. *Lactobacillus plantarum*. Aditivo alimentar. Estresse térmico.

2.1 INTRODUÇÃO

Os crustáceos são organismos de elevado interesse econômico e com alta representatividade no setor aquícola. O camarão branco do pacífico *Litopenaeus vannamei* representa a espécie mais presente na carcinicultura (80%), seguida pelo *Penaeus monodon* (15%), e responde pelos maiores volumes de produção em nível mundial. De acordo com a *Food and Agriculture Organization of United Nations* (FAO), *L. vannamei* está entre os dez organismos aquáticos mais cultivados com valores de produção acima de 5 milhões de toneladas (FAO, 2022). Klongklaew et al. (2020) reforçam a importância deste decápode, pertencente à família Penaeidae, como uma relevante fonte de ganhos de exportação para os países em desenvolvimento na Ásia e América Latina.

A aquicultura de *L. vannamei* expandiu-se rapidamente em todo o mundo desde o início dos anos 2000, e os principais países produtores, incluindo a Tailândia, estão fora de sua área nativa (PANUTRAKUL; SENANAN, 2021). No Brasil, esta espécie foi introduzida na década de 80, sendo atualmente encontrada na quase totalidade dos cultivos no país e responsável por valores elevados de produção.

De acordo com Tu et al. (2010), a carcinicultura vem sendo adotada e consolidada como uma das maiores atividades aquícolas rentáveis mundialmente. Embora esta indústria esteja apresentando um crescimento positivo, as ameaças representadas pelas doenças permanecem, inclusive com o registro de doenças emergentes, e, conseqüentemente, os efeitos prejudiciais sobre a produtividade (PINOARGOTE et al., 2018). De acordo com Souza Valente et al. (2020) as doenças infecciosas são frequentemente o maior fator limitante no avanço da aquicultura. Assim como os fatores bióticos, os fatores abióticos também são fontes para o desencadeamento de surtos de doenças em camarões (MD ZOQRATT et al., 2018). Entre eles, Schleder et al. (2020) destacam o estresse ocasionado por baixas temperaturas como um importante fator desencadeante de enfermidades na carcinicultura.

Hindu et al. (2019) destacam que em sistema de confinamento, associado constantemente a altas densidades de estocagem, problemas de qualidade de água e falta de nutrientes, os organismos são mais afetados por condições de estresse, o que impacta seu sistema imunológico, o que, por sua vez, resulta em maior suscetibilidade a doenças. Esse quadro se reflete nos surtos de doenças que impactam negativamente a produção aquícola, associados a prejuízos econômicos consideráveis aos aquicultores em todo o mundo.

Nesse contexto, os autores supracitados destacam ainda que visando o tratamento de doenças, bem como aumentar o crescimento dos animais e a resistência a doenças, os antibióticos têm sido amplamente utilizados na indústria aquícola. Adicionalmente, Cárdenas

et al. (2015) salientam que na indústria de rações para aquicultura, as algas verdes e marrons têm sido usadas alternadamente em pequenas quantidades como aglutinantes e promotores de crescimento e por seu efeito nutracêutico, pois podem fortalecer o sistema imunológico contra o estresse.

Deste modo, buscando manter o desempenho zootécnico nos cultivos, diminuir o uso de antibióticos, amenizar e/ou reduzir a presença de patógenos e reforçar a saúde animal, a aquicultura vem adotando o uso de aditivos nas dietas fornecidas aos animais, tais como probióticos (AKHTER et al., 2015; DU et al., 2019; BOLÍVAR-RAMÍREZ et al., 2021) e extratos de algas (CUNHA; GRENHA, 2016; KLONKLAEW et al., 2020; SCHLEDER et al., 2020). Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de dietas formuladas com a macroalga *Ulva ohnoi* e o probiótico *Lactobacillus plantarum* sobre respostas bioquímicas do camarão marinho *L. vannamei* mantido em água clara, submetidos a estresse térmico.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento com os camarões foi conduzido nas dependências do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), Departamento de Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sendo a dieta controle produzida no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI), CCA, UFSC, enquanto a dieta contendo os aditivos (alga e/ou probiótico) foi preparada no LCM. As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), no Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAq), UFSC.

2.2.1 Material biológico

O estudo foi desenvolvido com exemplares de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* adquiridos da empresa AQUATEC Aquicultura Ltda. (Rio Grande do Norte, Brasil). Assim que os animais chegaram ao LCM/UFSC, foram aclimatados de modo a igualar a temperatura da água do transporte com a temperatura da água do sistema bioflocos, sendo, em seguida transferidos para um tanque de *Biofloc Technology System* -BFT, na mesma temperatura, onde permaneceram até atingirem o peso médio de 4g.

Os camarões foram alimentados quatro vezes ao dia com ração comercial Guabitech Inicial. O monitoramento da qualidade da água tais como, temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) era realizado duas vezes ao dia, enquanto amônia (mg.L^{-1}), nitrito (mg.L^{-1}), alcalinidade (mg.L^{-1}), salinidade (ppt) e pH eram registrados a cada três dias, assim como a relação de carbono:nitrogênio (C:N). Quando os animais obtiveram o peso médio desejado (4 g), foram coletados aleatoriamente, pesados e transferidos para tanques de água clara.

2.2.2 Delineamento experimental

O total de 560 camarões oriundos do sistema BFT, com peso médio de $4,0 \pm 0,2$ gramas foram distribuídos ao acaso em 16 unidades experimentais, de modo que cada tanque contivesse o número inicial de animais igual a 35. As unidades experimentais utilizadas neste estudo consistiram em caixas de polietileno com capacidade máxima para 500 L, as quais foram abastecidas com água do mar (após filtração mecânica e biológica) e mantida sob aeração constante através de sistema de ar fornecido por *blower*. A temperatura da água foi mantida em $29 \pm 0,5$ °C com auxílio de aquecedores (Roxin Ht-1900 Q5 300w) inseridos em cada tanque.

Os parâmetros físico-químicos da água de cultivo foram monitorados ao longo do período experimental. A renovação da água, retirada de restos alimentares, fezes e mudas eram realizados em dias alternados. Quanto à biometria dos camarões, esta era realizada a cada sete dias usando uma balança de precisão (Bel-S2202H 0,01g-2200g).

2.2.3 Preparo das dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas pela equipe do LCM, com o auxílio do software Optimal Fórmula 2000® versão 19102009, baseado nas recomendações e exigências nutricionais para *L. vannamei* (GONG et al., 2000; NRC, 2011; ZHOU et al., 2012).

A macroalga *Ulva ohnoi* foi coletada no mês de março do tanque de cultivo de peixes (*Mugil liza*) localizado no Laboratório de Piscicultura Marinha – LAPMAR. Após a coleta, as algas foram transportadas até o LCM, onde foi retirado qualquer material incrustado, sendo em seguida limpas rapidamente com água doce e secas à temperatura ambiente por aproximadamente 3 h. Em seguida, foram transferidas para estufa, onde permaneceram por 24 h a 38,5 °C com circulação de ar constante. A biomassa seca foi moída, peneirada e armazenada no freezer -20°C até a sua utilização.

As cepas bacterianas do probiótico *Lactobacillus plantarum* foram isoladas do trato digestivo de camarões juvenis *L. vannamei* ($12,0 \pm 2,0$ g) do cultivo do próprio LCM/UFSC (VIEIRA et al., 2008). Para adição da suspensão probiótica na dieta, o *L. plantarum* foi semeado em meio de cultura *Rogosa and Sharp* - MRS, em solução salina a 3 % e incubados a 35 °C por 24 h. Após o período de incubação, 10 mL da suspensão probiótica foi adicionada em 100 mL soro de leite (3% de NaCl e 2% de açúcar) e incubados a 35 °C. Na sequência, o probiótico foi armazenado e utilizado em até 48 h, sendo o mesmo inserido na dieta na concentração de unidade formadora de colônia a $1,7 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Os ingredientes secos foram previamente triturados e peneirados a 600 µm. Posteriormente, os microingredientes foram homogeneizados e, em seguida, adicionados os macroingredientes. Sucessivamente, os óleos, a lecitina de soja e água foram então

acrescentados. A mistura resultante foi peletizada em uma microextrusora (Inbramaq MX-40), seca em estufa a 40 °C e posteriormente a ração finalizada foi mantida sob refrigeração até o início do experimento (figura 4). O preparo da ração foi realizado conforme descrito por Legarda et al. (2021), com utilização de 2 % de biomassa seca de *Ulva ohnoi*. O probiótico *L. plantarum* (já em soro de leite) foi pipetado e misturado na ração 30 minutos antes de serem ofertadas aos animais, sendo o volume de 100 mL de probiótico por quilograma na dieta (cada grama de ração continha probiótico na concentração de $1,7 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) (VIEIRA et al., 2008). Deste modo, para o experimento com as dietas experimentais, foram utilizadas as seguintes dietas:

- a) Dieta controle: sem aditivos;
- b) Dieta alga: contendo biomassa seca de *Ulva ohnoi*;
- c) Dieta probiótico: dieta controle contendo o probiótico *Lactobacillus plantarum* ($1,7 \times 10^8$ UFC mL⁻¹/g de ração);
- d) Dieta alga + probiótico (A + P): *U. ohnoi* + *Lactobacillus plantarum* ($1,7 \times 10^8$ UFC mL⁻¹/g de ração).

Figura 4 - Rações experimentais. A) Ração controle (sem aditivos). B) Ração formulada com biomassa seca de *Ulva ohnoi*.



Fonte: Elaborado pela autora.

A alimentação foi fornecida quatro vezes ao dia. A composição centesimal da ração foi analisada de acordo com o descrito por *Official Methods of Analysis* (AOAC, 1999). Os ingredientes utilizados e a composição centesimal da ração estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1 - Formulação e composição centesimal da ração utilizada.

Ingredientes (g kg⁻¹)	Dieta controle	Dieta alga	Dieta probiótico	Dieta A+P
<i>U. ohnoi</i> (%)	0	2	0	2
<i>L. plantarum</i> (%)	0	0	1,7x10 ⁸ UFC mL ⁻¹ /g	1,7x10 ⁸ UFC mL ⁻¹ /g
Farinha de trigo	150,00	150,00	150,00	150,00
Farelo de soja	324,63	324,63	324,63	324,63
Carboximetilcelulose	5,00	5,00	5,00	5,00
Lecitina de soja	25,00	25,00	25,00	25,00
Fosfato monocálcico	25,00	25,00	25,00	25,00
Óleo de soja	10,00	10,00	10,00	10,00
Vitamina C	0,70	0,70	0,70	0,70
Premix vitamínico ¹	5,00	5,00	5,00	5,00
Premix mineral ²	17,00	17,00	17,00	17,00
Sulfato de magnésio	15,00	15,00	15,00	15,00
Caulim	100,00	100,00	100,00	100,00
Cloreto de sódio	12,00	12,00	12,00	12,00
Cloreto de potássio	10,00	10,00	10,00	10,00
Metionina	5,00	5,00	5,00	5,00
Resíduo de peixe	150,00	150,00	150,00	150,00
Farinha de vísceras	125,67	125,67	125,67	125,67
Óleo de peixe	20,00	20,00	20,00	20,00
Umidade	9,04			
Proteína bruta	39,60			
Extrato etéreo	8,71			
Fibra bruta	1,87			
Cinzas	17,65			

Premix vitamínico¹: vit. A - 900 mg kg⁻¹; vit. D3 - 25 mg kg⁻¹; vit. E - 46.900 mg kg⁻¹; vit. K3 - 1.400 mg kg⁻¹; cobalamina (B12) - 50 mg kg⁻¹; piridoxina (B6) - 33.000 mg kg⁻¹; riboflavina - 20.000 mg kg⁻¹; ácido nicotínico - 70.000 mg kg⁻¹; ácido pantotênico - 40.000 mg kg⁻¹; biotina - 750 mg kg⁻¹; ácido fólico - 3.000 mg kg⁻¹; Premix mineral²: cobre - 2.330 mg kg⁻¹; zinco - 10.000 mg kg⁻¹; manganês - 6.500 mg kg⁻¹; selênio - 125 mg kg⁻¹; iodo - 1.000 mg kg⁻¹; cobalto - 50 mg kg⁻¹; magnésio - 20 g kg⁻¹; potássio - 6,1 g kg⁻¹

O experimento foi conduzido durante 45 dias. Ao longo da fase experimental, os parâmetros físico-químicos da água de cultivo, temperatura (°C) e oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹), foram monitorados uma vez por dia (YSI 55, YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, EUA). Enquanto, uma vez por semana foram monitorados o pH (pHmetro Tecnal®), salinidade (ppt) (Eco-Sense YSI EC30), a alcalinidade (mg.L⁻¹) (APHA, 2005), nitrito (mg.L⁻¹) e amônia total (mg.L⁻¹) de acordo com Strickland e Parsons (1972), sendo corrigidos que necessário.

2.2.4 Obtenção dos parâmetros zootécnicos

Os dados zootécnicos foram obtidos de acordo com as fórmulas apresentadas a seguir. Sendo o ganho de peso semanal e o fator de conversão alimentar realizados a cada sete dias a

fim de realizar os reajustes na quantidade das rações ofertadas aos camarões. O peso total foi obtido ao final dos 45 dias de cultivo, assim como a sobrevivência.

- a) Ganho de Peso Semanal (g/s) = {[peso médio final (g) – peso médio inicial (g)] / dias de cultivo} * 7;
- b) Peso Final (g) dos animais ao final do experimento;
- c) Fator de Conversão Alimentar (CA) = ração consumida (kg)/biomassa de camarão produzida (kg);
- d) Sobrevivência (%) = (número final de camarões / número inicial de camarões) * 100.

Ao final deste período, 20 camarões de cada dieta alimentar foram destinados imediatamente para coleta de tecidos, a fim de avaliar as respostas destes animais frente às dietas experimentais. Enquanto outros 40 camarões de cada dieta foram destinados para o tratamento do estresse térmico causado pela baixa temperatura.

2.2.5 Estresse térmico

2.2.5.1 Temperatura letal

A temperatura para o estresse térmico foi estabelecida através de um teste prévio de temperatura letal (TL₅₀), na qual, camarões (n = 40) foram submetidos a três temperaturas 11,5 °C, 12 °C e 12,5 °C durante 1 hora. A temperatura na qual foi observada mortalidade de 50 % (11,5 °C) foi estabelecida para o estresse térmico ao qual os camarões tratados com as diferentes dietas foram posteriormente submetidos.

2.2.5.1 Estresse térmico

O choque térmico foi realizado de acordo com metodologia descrita por Costa Rezende et al. (2021). Para o estresse térmico, 160 camarões (n=40/dieta) foram transferidos das unidades experimentais para aquários com capacidade para 60 L, sob aeração constante e temperatura de 11,5 ± 0,1 °C (TL₅₀ pré estabelecida) constante por 1h. Após esse período, os animais foram imediatamente transferidos para novas unidades experimentais (500 L) nas mesmas condições de cultivo anterior, ou seja, água clara, temperatura mantida a 28,3 ± 0,6 °C e aeração constante. Durante o experimento de estresse térmico, os animais não foram alimentados. Os animais foram monitorados ao longo de 48 h, e o número de animais mortos foi registrado a cada duas horas.

2.2.6 Coleta de tecidos

Assim que cada tratamento foi finalizado, os tecidos foram imediatamente coletados. A hemolinfa foi extraída da região ventral do abdômen, entre o cefalotórax e o primeiro segmento abdominal. De cada animal foram coletados 200 µL de hemolinfa na presença de solução anticoagulante (citrato de sódio a 10 %) com auxílio de agulhas acopladas a seringas

de 1 mL esterilizadas, previamente refrigeradas (a 4 °C), na proporção de 1:1. As amostras de hemolinfa coletadas foram mantidas a -20 °C até o uso. Os hepatopâncreas foram retirados, transferidos para microtubos e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras coletadas foram encaminhadas para o LABCAI para a análises bioquímicas.

2.2.7 Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada nas condições descritas por Moser (2011) a partir das amostras de hemolinfa. A extração do ácido nucleico foi realizada inicialmente com a ruptura da membrana celular através de solução de lise Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0) e Solução de Dodecilsulfato de Sódio (SDS) a 1% e proteinase K (1mg.mL⁻¹), incubados a 65 °C por 45 minutos. A incubação foi seguida pela adição de NaCl 5M e CTAB 10% à mistura, e nova incubação a 55 °C por 35 minutos, em seguida, foi adicionado clorofórmio-isoamílico e centrifugado a 14000 x g durante 8 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes foram separados em um novo microtubo e em seguida foi adicionado isopropanol. O precipitado de DNA foi lavado com etanol duas vezes, eluído em água para biologia molecular ultrapura e mantido a -20 °C até o uso. O grau de pureza das amostras de DNA, a relação dos valores de Absorbância a 260/280 nm e 260/230 nm foram mensurados em espectrofotômetro UV (NanoDrop 2000, ThermoScientific®).

2.2.8 *Screening* para os vírus IHHNV e WSSV: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A eventual presença dos patógenos virais, o vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética Infecciosa – IHHNV e, o vírus da Síndrome da Mancha Branca – WSSV, foi investigada a partir da amplificação de sequências genômicas alvo, através da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), utilizando-se os iniciadores mostrados na tabela 2. No caso do WSSV foi realizada uma PCR de dois passos (*Nested* PCR), com base no protocolo descrito por Lo et al. (1996). Os produtos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 2%, corados com GelRed® (Biotium).

Tabela 2 - Pannel de iniciadores utilizados para detecção de patógenos (IHHNV e WSSV) relacionados à infecção natural.

Gene alvo	Sequência dos iniciadores	Referência
IHHNV	5'-TCGGAAAACACTGAACACTGGCCT-3' 5'-CGGCGTGTTCTTCGTCTTCATT-3'	Moser (2005)
WS 146F1 WS 146R1	5'- ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG-3' 5'-TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACG-3'	Lo et al. (1996)
WS 146F2 WS 146R2	5'- GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA-3' 5'- TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT-3'	

2.2.9 Índice de condição fisiológica (RNA/DNA)

O índice de condição fisiológica dos exemplares foi realizado a partir de amostras de hepatopâncreas de camarões submetidos às dietas experimentais (n=10/dieta) e ao tratamento por estresse térmico (n=10/dieta). Para a realização dessas análises, a extração do material genômico (RNA e DNA) e a obtenção do índice de condição fisiológica foram realizados de acordo com os procedimentos descritos por Kaplan; Leamon; Crivello (2001), seguido de modificações e adequações para *L. vannamei*. Para esta análise foram pesados de 90 a 100 mg de tecido/animal, transferidos para microtubo e, em seguida, realizada a digestão dos tecidos em solução de lise (Tris 10 mM, NaCl 0,1 mM, SDS 0,2%, pH 8.0) e 10 µL proteinase K a 20 mg/mL, sendo as amostras incubadas por 45 minutos a 55 °C. Para a obtenção do sobrenadante as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi separado em duas partes e transferido para tubos novos.

Parte do sobrenadante foi diluído e a concentração de DNA das amostras foi quantificado em placa de 96 poços por fluorometria (SpectraMax M5, Molecular Devices) no comprimento de onda entre 480-520 nm com auxílio do corante PicoGreen™ (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA assay kit – Invitrogen, USA). Para a leitura do RNA, o sobrenadante foi incubado em banho seco a 35 °C por 30 minutos, seguido de digestão com DNase (DNase I recombinant Sigma-Aldrich) e diluição em 49 µL de TE 1X (1:50). O RNA foi quantificado em placa de 96 poços com o corante RiboGreen™ (Quant-iT™ RiboGreen™ RNA assay kit – Invitrogen, USA) no comprimento de onda de 485-530 nm. A leitura das absorvâncias das amostras foi realizada em duplicata.

Foram realizadas curvas padrões com condições de absorvância e diluições distintas para DNA e RNA, sendo o corante PicoGreen diluído em 1:200 e o corante RiboGreen diluído em 1:2000 para a obtenção das respectivas curvas. Ao final, as razões RNA/DNA foram obtidas pela divisão de seus respectivos valores de absorvância.

2.2.10 Peroxidação lipídica

O ensaio de TBARS foi usado para quantificar o dano oxidativo, em termos de peroxidação lipídica, em hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei*, de acordo com as condições descritas por Almeida et al. (2003). Para este ensaio foram utilizadas entre 80 e 100 mg de hepatopâncreas de *L. vannamei* dos grupos das dietas experimentais (n=10/dieta) e do tratamento estresse térmico (n=10/dieta).

As amostras foram pesadas separadamente e transferidas para tubos de 2 mL, sendo, em seguida, adicionados 300 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Posteriormente, os tecidos foram homogeneizados e, ao homogeneizado foram acrescidos 300 µL de uma solução a 0,4%

de ácido tiobarbitúrico (TBA), previamente diluída em HCl 0,2M. As amostras foram aquecidas a 90 °C por 40 minutos. Em seguida 1,0 mL de 1-butanol foi adicionado às amostras e, as mesmas foram centrifugadas a 5.000 g por 5 minutos a 4 °C. Ao final da centrifugação, 200 µL de sobrenadante de cada amostra foram quantificados em uma placa de 96 poços. A leitura das absorvâncias das amostras (em duplicatas) foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535nm.

2.10.11 Análise estatística

Os resultados do desempenho zootécnico (ganho de peso semanal e ganho de peso final) e das análises bioquímicas (índice de condição fisiológica e peroxidação lipídica) foram submetidos aos pressupostos de Shapiro-Wilk (para normalidade) e Bartlett (para homocedasticidade), ao atenderem os pressupostos, os dados foram submetidos a ANOVA *one-way* e por fim foram realizados testes de múltiplas comparações de médias, teste Tukey. A sobrevivência foi avaliada através da curva de Kaplan-Meyer. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 8 utilizando α 0,05 como nível de significância.

2.3 RESULTADOS

Foram realizados dois experimentos a fim de identificar o efeito de dietas contendo aditivos alimentares, o primeiro foi realizado ao longo de 45 dias, onde 560 camarões foram distribuídos em 16 unidades experimentais e avaliados semanalmente quanto às respostas zootécnicas frente a alimentação fornecida. O segundo experimento consistiu em submeter os animais que receberam as dietas do primeiro experimento ao estresse térmico em baixa temperatura 11,5 °C por 1 hora, seguido de transferência para tanques a $28 \pm 0,6$ °C. As análises bioquímicas, índice de condição fisiológica e peroxidação lipídica foram realizadas utilizando hepatopâncreas dos exemplares que receberam as dietas experimentais e daqueles que foram submetidos ao estresse térmico pós-dietas.

2.3.1 Qualidade da água do cultivo

Ao longo do experimento, a temperatura e o oxigênio dissolvido foram mantidos em $28,73 \pm 0,75$ °C e $5,64 \pm 0,40$ mg L⁻¹, respectivamente, tendo permanecido constantes ao longo de todo o período do experimento. Os demais parâmetros físico-químicos de qualidade de água, como salinidade e amônia total, também se mantiveram dentro dos padrões adequados para o cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de água clara (tabela 3) (WYK; SCARPA, 1999; MAIA et al., 2012; BARDERA et al., 2019).

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos de qualidade de água ao longo do tratamento com dietas experimentais (ao longo de 45 dias de cultivo).

Parâmetro	Média ± Desvio padrão
Temperatura (°C)	28,3 ± 0,63
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	5,69 ± 0,57
pH	8,0 ± 0,14
Salinidade (ppt)	32,51 ± 0,74
Alcalinidade (mg.L ⁻¹)	123,06 ± 4,47
Amônia total (mg.L ⁻¹)	1,02 ± 0,6
Nitrito (mg.L ⁻¹)	0,03 ± 0,05

2.3.2 Dados zootécnicos

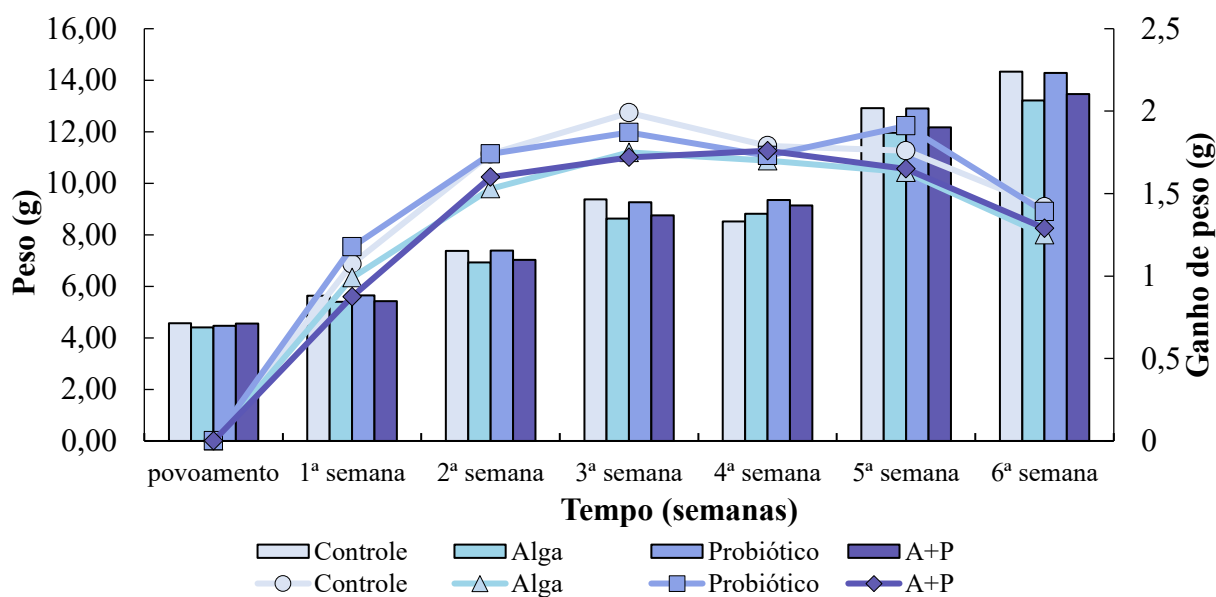
2.3.2.1 Dietas experimentais

Semanalmente os animais passavam por biometrias para o acompanhamento do desempenho zootécnico, tais como o ganho de peso semanal (g), peso semanal (g), peso final (g), sobrevivência (%) e fator de conversão alimentar (FCA). Os resultados estatísticos indicaram não haver diferença significativa entre os grupos das dietas experimentais quando se avaliou o ganho de peso semanal ($p > 0,05$).

Embora a média de ganho de peso semanal dos animais das diferentes dietas não tenha apresentado diferença estatística, cabe ressaltar que, o grupo dos animais que recebeu a dieta contendo probiótico apresentou um ganho de 1,64 g ± 0,29, sendo ligeiramente próximo ao grupo dos animais alimentados com a dieta sem aditivos, com ganho na faixa de 1,63 g ± 0,33. Os grupos alga + probiótico e alga, apresentaram médias de 1,50 g ± 0,46 e 1,48 g ± 0,31, respectivamente, conforme a figura 5 (linhas).

Em consonância com o ganho de peso semanal, o peso semanal dos animais das diferentes dietas também não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$). A figura 5 (barras) representa o peso semanal de cada grupo, indicando que os animais estavam respondendo positivamente ao alimento oferecido a eles. O peso semanal foi visivelmente crescente ao longo do tratamento alimentar, sendo o menor peso semanal observado no grupo alimentado com a alga *U. ohnoi* (8,90 g ± 0,37), e o maior ganho semanal observado no grupo que recebeu a dieta contendo o probiótico *Lactobacillus plantarum* (9,82 g ± 0,16). O grupo controle (9,77 g ± 0,22) e o grupo com a combinação dos aditivos alga + probiótico (9,00 g ± 0,12) apresentaram diferença de 0,77 g entre si.

Figura 5 - Ganho de peso semanal (g) de camarões alimentados com diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca de *Ulva ohnoi*), probiótico (ração controle + *Lactobacillus plantarum*), alga + probiótico (ração biomassa seca de *U. ohnoi* + *L. plantarum*).



Ao final do período experimental foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) no peso final entre os grupos analisados. O peso final dos animais alimentados com a dieta contendo o probiótico *Lactobacillus plantarum* foi estatisticamente diferente do grupo controle ($p=0,0357$) e do grupo alga ($p < 0,0001$), enquanto este, por sua vez, também diferiu do grupo alga + probiótico ($p < 0,0001$) e do grupo controle ($p < 0,0467$). Desta forma, o grupo probiótico apresentou peso corporal final de $14,83 \text{ g} \pm 1,05$, seguido do grupo alga + probiótico com $14,17 \text{ g} \pm 1,20$, grupo controle com $13,55 \text{ g} \pm 1,67$ e grupo alga com $12,32 \text{ g} \pm 0,88$ (figura 6).

Os resultados referentes ao fator de conversão alimentar indicaram não haver diferença ($p > 0,05$) entre os grupos analisados, no entanto, os camarões da dieta probiótico ($1,43 \pm 0,07$), e do grupo controle ($1,47 \pm 0,06$) apresentaram valores ligeiramente inferiores aos observados para o grupo da dieta alga ($1,56 \pm 0,08$) e alga + probiótico ($1,56 \pm 0,04$).

Em relação à sobrevivência dos animais que receberam as dietas formuladas (45 dias de cultivo), não foi encontrada diferença entre os grupos. No entanto, o grupo com a menor porcentagem de sobrevivência foi o grupo controle com 96 %, enquanto os grupos alga, probiótico e alga + probiótico ao final do experimento apresentaram uma taxa de sobrevivência de 99 % para cada um grupo mencionado (figura 7).

Figura 6 - Peso final de camarões alimentados durante 45 dias com as dietas experimentais: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*).

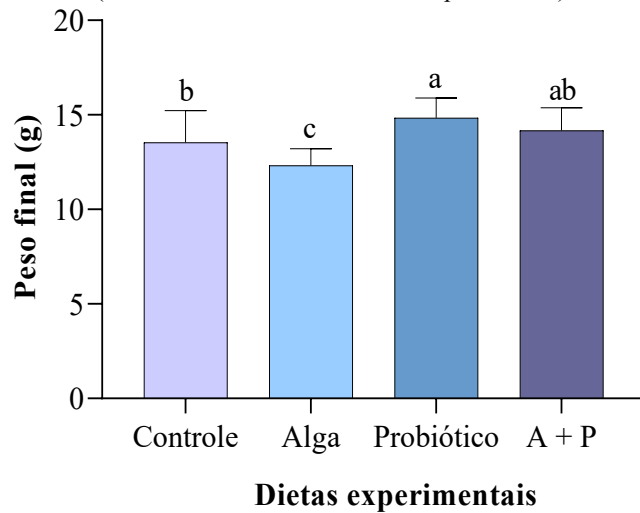
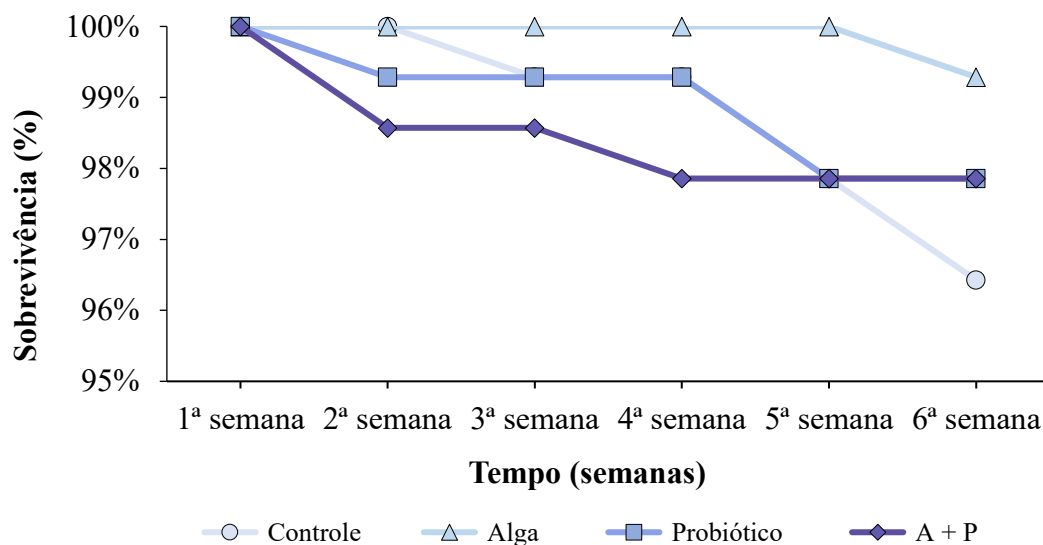


Figura 7 - Sobrevivência final do *Litopenaeus vannamei* após 45 dias de cultivo em sistema de cultivo de água clara e alimentados diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*).

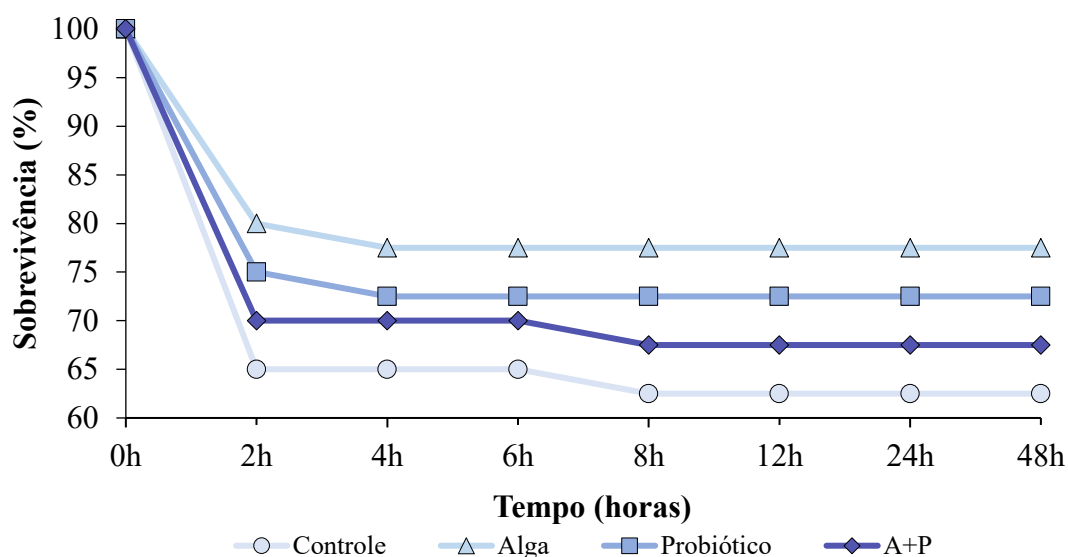


2.3.3 Estresse térmico

Após o período em que foram alimentados com dietas formuladas, 40 camarões de cada grupo alimentar foram submetidos ao estresse térmico a baixa temperatura por 1 hora (a 11,5 °C). Em seguida, os animais foram imediatamente transferidos para tanques com 500 L de água clara mantida a 28,7 ± 0,3 °C (temperatura prévia de manutenção dos animais), onde permaneceram por 48h. De acordo com o teste estatístico, Log-rank (Mantel-Cox) não houve diferença significativa ($p > 0,05$) de sobrevivência entre os grupos, porém, o grupo dos animais alimentados somente com a dieta alga apresentou taxa de sobrevivência, com 77,5%, enquanto

o grupo responsável pela menor sobrevivência foi o grupo da dieta controle com um percentual de 62,5% (figura 8).

Figura 8 - Sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* submetidos a estresse térmico. Camarões alimentados durante 45 dias com diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*).



2.3.4 Avaliação da presença prévia de patógenos virais (ocorrência de infecção natural)

Para avaliar o estado sanitário prévio dos camarões a serem submetidos às dietas experimentais e ao estresse térmico, foi realizada uma triagem para avaliar a eventual presença dos vírus IHHNV e WSSV. Para tal triagem foram utilizados 10 animais, escolhidos aleatoriamente, antes do início dos experimentos. De forma análoga, ao final dos experimentos, um total de 20 camarões, submetidos a cada uma das diferentes dietas, foi avaliado quanto a presença ou ausência dos mesmos dois vírus, visando avaliar uma eventual relação do estado sanitário prévio dos animais com os parâmetros analisados. O mesmo procedimento foi realizado com os animais submetidos ao estresse térmico.

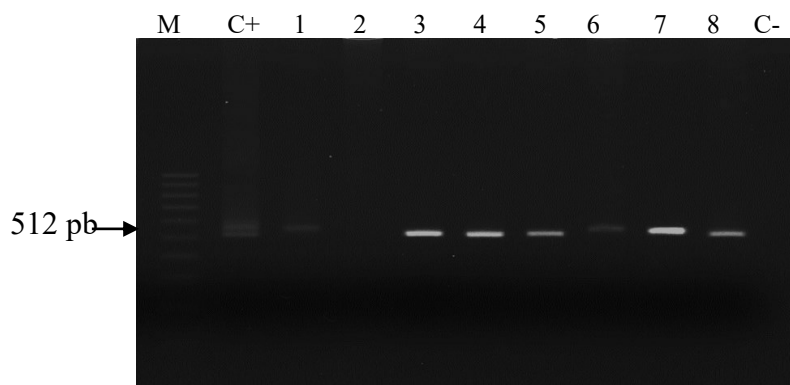
A detecção da eventual presença dos vírus foi baseada do padrão de bandas dos produtos de PCR, visualizadas em eletroforese em gel de agarose (figura 9). A presença de um fragmento correspondente a 512 pares de base indicou resultado positivo, ou seja, a ocorrência do IHHNV na amostra. Os resultados (expresso em percentual, %) são apresentados na tabela 4. Não foi detectada a presença de bandas correspondentes à presença do vírus WSSV nos camarões analisados, após a PCR de dois passos (*nested* PCR).

Tabela 4 - Presença do vírus IHHNV em *Litopenaeus vannamei* após 45 dias de cultivo, nos grupos alimentados com quatro dietas distintas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*) (n=20 camarões/grupo), e presença do vírus IHHNV em *L. vannamei* após 45 dias de cultivo recebendo diferentes dietas e submetidos a estresse térmico (n=20 camarões/grupo).

Grupos	Presença do vírus IHHNV (%)			
	Controle	Alga (A)	Probiótico (P)	Alga + Probiótico
Dietas	50	60	55	78
Choque térmico	60	75	85	85

Os resultados referentes à presença do IHHNV nos grupos submetidos às diferentes dietas mostram percentuais superiores a 50 % em todos os grupos analisados, com exceção do grupo da dieta sem aditivos (controle), cujo valor percentual foi igual a 50 %. Os exemplares que receberam a dieta contendo alga + probiótico foram os que apresentaram a maior ocorrência natural do patógeno.

Figura 9 - Detecção de IHHNV em amostras de hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas. Gel de agarose a 2% representativo dos produtos amplificados por PCR, após eletroforese e coloração com GelRed®. M: marcador de peso molecular (100 pb), C +: controle positivo, C -: controle negativo, amostra 2: IHHNV não detectado, amostras 1 – 8: detecção de IHHNV. Fragmento da região alvo do genoma do vírus correspondente a 512 pb.



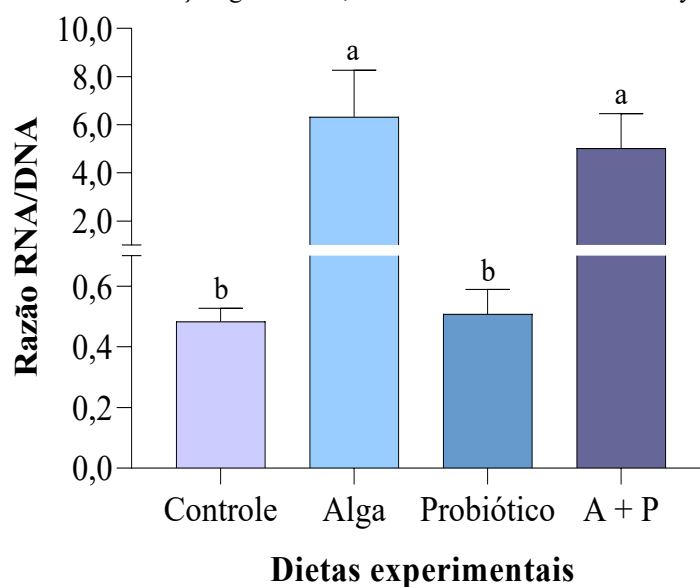
2.3.5 Índice de condição fisiológica

2.3.5.1 Dietas experimentais: razão RNA/DNA

O índice de condição fisiológica avaliado para os camarões que foram alimentados com as diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga *U. ohnoi*, probiótico *L. plantarum* e alga + probiótico (A + P), durante 45 dias, apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). De acordo com o teste comparador de médias, Tukey, os camarões que receberam as dietas alga ($6,33 \pm 1,93 \mu\text{g}/\text{mg}$) e dieta alga + probiótico ($5,03 \pm 1,42 \mu\text{g}/\text{mg}$) não diferiram entre si, mas foram estatisticamente diferentes da dieta controle (sem aditivos) ($0,48 \pm 0,04$

$\mu\text{g}/\text{mg}$) e da dieta probiótico ($0,50 \pm 1,14 \mu\text{g}/\text{mg}$), sendo que estas duas últimas se mostraram sem diferença significativa entre si (figura 10).

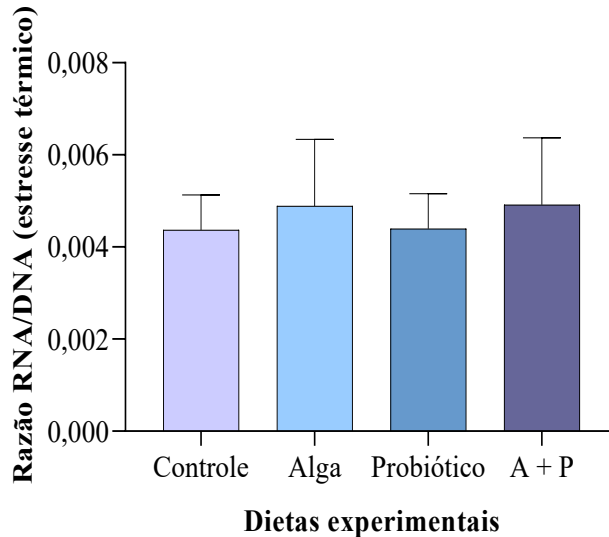
Figura 10 - Índice de condição fisiológica (razão RNA/DNA) de *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*). Letras diferentes indicam diferença significativa, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



2.3.5.2 Estresse térmico: razão RNA/DNA

A análise da condição fisiológica através da razão RNA/DNA, dos animais submetidos ao estresse térmico indicou não haver diferença significativa entre os grupos dietas controle, alga *U. ohnoi*, probiótico *L. plantarum* e A + P ($p > 0,05$) (figura 11).

Figura 11 - Índice de condição fisiológica (razão RNA/DNA) de *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*) submetido a estresse térmico ao final de 45 dias de cultivo.

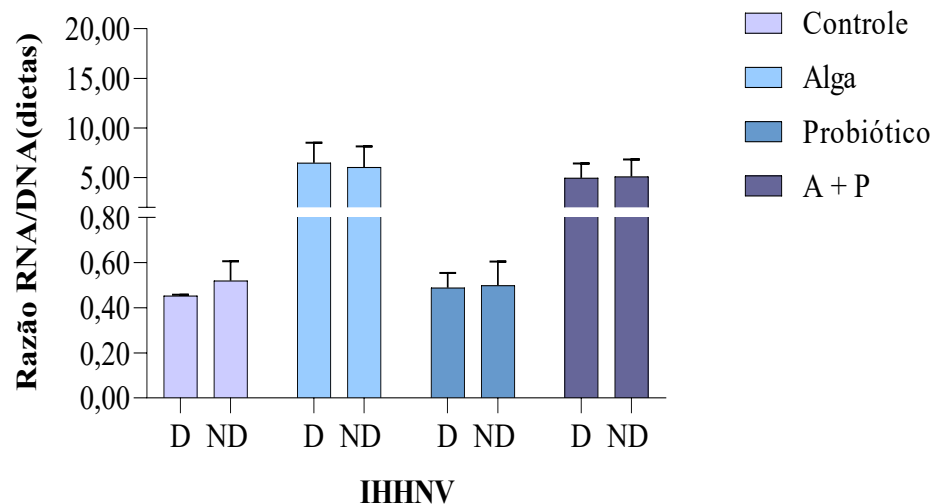


2.3.6 Índice de condição fisiológica x IHHNV

2.3.6.1 Dietas experimentais

Uma avaliação comparativa dentro dos grupos positivos e negativos para o vírus IHHNV foi realizada, sendo os indivíduos desta análise os mesmos utilizados para o índice de condição fisiológica. A análise estatística não indicou diferença significativa entre os animais com e sem o vírus (figura 12).

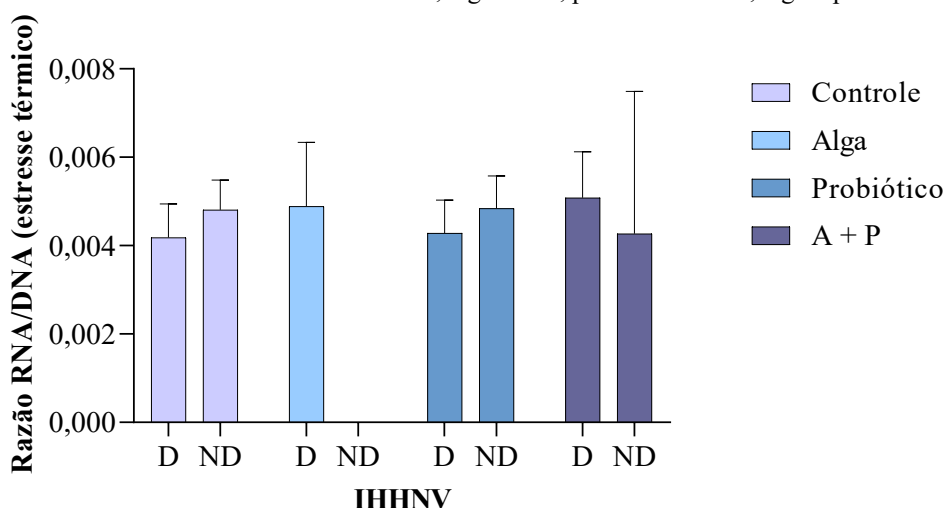
Figura 12 – Índice de condição fisiológica (razão RNA/DNA) considerando a presença ou ausência do vírus IHHNV em *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas durante 45 dias. Detectado: D, Não detectado: ND. IHHNV detectado: controle: n = 2; alga: n = 6; probiótico: n = 4; alga + probiótico: n = 5. IHHNV não detectado: controle: n = 8; alga: n = 4; probiótico: n = 4; alga + probiótico n = 3.



2.3.6.2 Estresse térmico

Os animais submetidos ao estresse térmico, também, foram avaliados quanto à presença ou ausência de IHHNV e as razões de ácidos nucleicos (RNA/DNA). No entanto, cabe ressaltar que para as amostras deste ensaio não foi possível realizar teste estatístico para a avaliação comparativa dos índices de condição fisiológica, considerando a ausência e a presença do vírus, devido ao n amostral baixo e díspare entre os grupos. Entretanto, a fim de mostrar visualmente esses dados, os índices de condição fisiológica nos grupos submetidos ao estresse térmico estão mostrados na figura 13.

Figura 13 - Índice de condição fisiológica (razão RNA/DNA) considerando a presença ou ausência de IHHNV em *Litopenaeus vannamei* submetidos ao estresse térmico. Detectado: D, Não detectado: ND. IHHNV detectado: controle $n = 7$; alga: $n = 10$, probiótico: $n = 8$; alga + probiótico: $n = 8$. IHHNV não detectado: controle: $n = 3$; alga: $n = 0$; probiótico: $n = 2$; alga + probiótico: $n = 2$.



2.3.7 Peroxidação lipídica

2.3.7.1 Dietas experimentais

Ao analisar os resultados do nível do produto da peroxidação lipídica (MDA), foi observado que o grupo dos animais alimentados com a dieta combinada alga + probiótico (A + P) mostrou os maiores níveis de MDA, apresentando deste modo, diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos (figura 14).

2.3.7.2 Estresse térmico

Para as amostras dos camarões submetidos ao estresse térmico, os resultados indicaram não haver diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos alimentados com as dietas formuladas e a dieta controle (figura 15). Comparativamente, os níveis de MDA foram visivelmente inferiores aos observados nos exemplares que não passaram por estresse térmico. No entanto, o valor observado para a dieta alga foi ligeiramente superior em relação às outras com valores na faixa de $15,02 \pm 2,02$ TBARS nmol.g^{-1} , enquanto as dietas controle, alga +

probiótico e probiótico apresentaram valores iguais a $13,14 \pm 2,60$, $12,66 \pm 4,10$ e $12,13 \pm 3,19$ TBARS nmol.g^{-1} , respectivamente.

Figura 14 - Quantificação do produto final da peroxidação lipídica (MDA) em hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

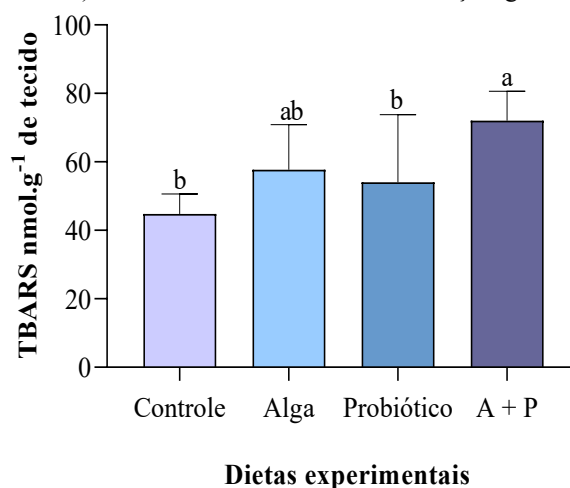
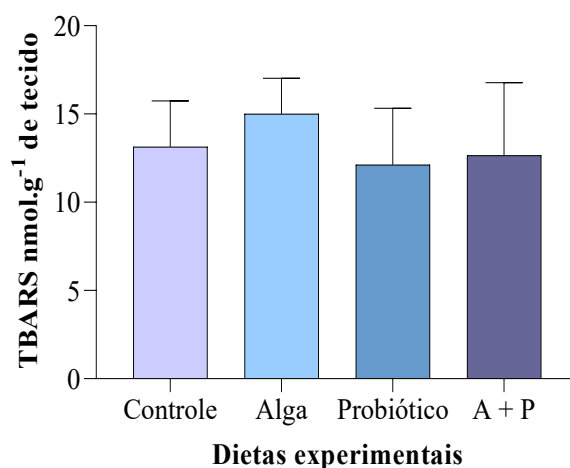


Figura 15 - Quantificação do produto da peroxidação lipídica em hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas: controle (sem aditivos), alga (biomassa seca da macroalga *Ulva ohnoi*), probiótico (dieta controle + *Lactobacillus plantarum*) e dieta alga + probiótico (dieta combinada: *U. ohnoi* + *L. plantarum*) submetidos a estresse térmico.



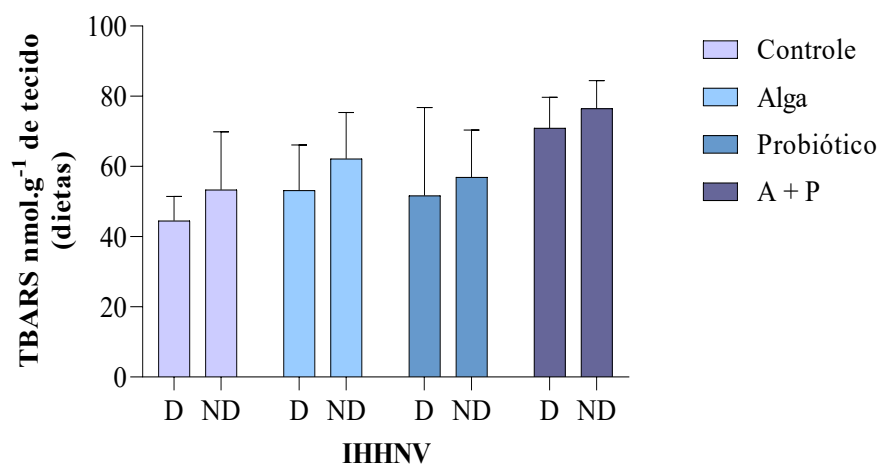
2.3.8 Peroxidação lipídica x IHHNV

2.3.8.1 Dietas experimentais

O teste de Dunnett's, indicou não haver diferença significativa entre as amostras dos animais das diferentes dietas quanto ao nível de peroxidação lipídica, considerando os animais positivos e negativos para o IHHNV (figura 16).

Figura 16 - Quantificação do produto final da peroxidação lipídica considerando a presença ou ausência de IHHNV em *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes

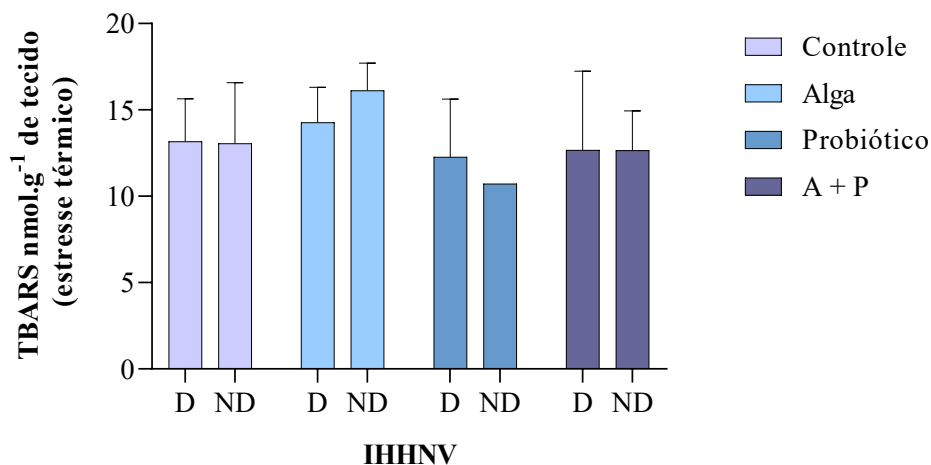
dietas ao longo de 45 dias. Detectado: D, Não detectado: ND. IHHNV detectado: controle n = 6; alga: n = 5, probiótico: n = 5; alga + probiótico: n = 8. IHHNV não detectado: controle: n = 4; alga n = 5; probiótico: n = 5; alga + probiótico: n = 2.



2.3.8.2 Estresse térmico

O nível de peroxidação lipídica em relação aos camarões positivos e camarões negativos dos grupos submetidos ao estresse térmico, de acordo com o teste não-paramétrico de Dunnett's, não apresentou diferença significativa entre os grupos (figura 17).

Figura 17 - Quantificação do produto final da peroxidação lipídica considerando presença ou ausência de IHHNV em *Litopenaeus vannamei* alimentandos com diferentes dietas ao longo de 45 dias e submetidos a estresse térmico. Detectado: D, Não detectado: ND IHHNV detectado: controle n = 7; alga: n = 6, probiótico: n = 9; alga + probiótico: n = 8. IHHNV não detectado: controle: n = 3; alga: = 4; probiótico: n = 1; alga + probiótico: n = 2.



2.4 DISCUSSÃO

A indústria aquícola, em especial a carcinicultura, vem adotando a inclusão de aditivos alimentares nas rações ofertadas aos animais, dentre eles os probióticos e as macroalgas. Essa estratégia está relacionada com a ampla produção de *Litopenaeus vannamei*, visando atender as exigências não apenas nutricionais, mas também as exigências relacionadas à saúde deste crustáceo em condições de cultivo. O presente estudo buscou avaliar respostas relacionadas ao desempenho zootécnico e respostas bioquímicas de *Litopenaeus vannamei* frente às dietas

formuladas contendo *Ulva ohnoi* como aditivo alimentar, de forma isolada, assim como o probiótico *Lactobacillus plantarum*, além do uso combinado destes dois aditivos alimentares, após período de cultivo de 45 dias e pós estresse térmico.

Ao longo do cultivo realizado durante 45 dias em tanques com água clara, os parâmetros de qualidade de água monitorados permaneceram dentro da faixa indicada para *L. vannamei* (WHETSTONE et al., 2002). Dentro dos parâmetros físico-químicos da água, há grande destaque para as interações temperatura e temperatura-salinidade, pois são os principais fatores que modulam o crescimento, a taxa de alimentação e o consumo de oxigênio, como apontam Bardera et al. (2019). Deste modo, os resultados relativos aos parâmetros de qualidade da água do presente estudo indicam que o ambiente foi satisfatório para o camarão *L. vannamei*.

No entanto, cabe ressaltar que durante a quarta semana da fase experimental houve um declínio nos parâmetros zootécnicos avaliados. Provavelmente, mesmo que momentâneo, este declínio pode estar relacionado à baixa temperatura da água captada observada neste período. O abastecimento dos tanques ocorria através de bombeamento de água do mar, a qual sempre passava por aquecimento antes de ser distribuída para os tanques, a fim de manter a temperatura da água captada igual a temperatura da água dos tanques de cultivo, evitando desta forma oscilações muito drásticas.

De acordo com Schleder (2017), quando o *L. vannamei* é submetido a baixas temperaturas ocorre uma descompensação das atividades metabólicas do organismo, o que pode ter afetado o desempenho dos animais. Em áreas de cultivo, decréscimos na temperatura, como observado em nosso estudo, também foram relatados por Krummenauer (2008), tendo sido, nesse caso, registrada uma queda da temperatura da água dos tanques até 18 °C (na primeira semana de cultivo), o que de acordo com o autor, não afetou a sobrevivência do lote, porém impactou o crescimento semanal dos camarões.

Recentemente, o uso de algas do gênero *Ulva* sp. para alimentação de peixes (VIZCAÍNO et al., 2019), de crustáceos (camarão branco do pacífico) (KLONKLAEW et al., 2020), como alternativa para a produção agrícola (PRABHU et al., 2019), na fitorremediação (BASTOS et al., 2019; MANGOTT et al., 2020), dentre outros, tem sido amplamente estudado na aquicultura. Até o momento, pesquisas especificamente com a macroalga *Ulva ohnoi* como aditivo alimentar para a espécie *L. vannamei* ainda não foram registradas.

No presente estudo, dentre os parâmetros de desempenho zootécnico avaliados (ganho de peso semanal, peso semanal, peso final, sobrevivência e fator de conversão alimentar),

somente o peso final foi significativamente diferente entre as dietas, sendo possível verificar que o peso final dos animais alimentados com a dieta contendo o probiótico *Lactobacillus plantarum* foi estatisticamente diferente dos outros grupos. O grupo alga, por sua vez, também diferiu do grupo alga + probiótico (A + P). Em termos zootécnicos, nossos achados foram diferentes daqueles observados por Bolívar-Ramírez et al. (2021) com dietas com aditivos ofertadas a *Litopenaeus vannamei*. Em seu estudo, afirmaram que este probiótico reduziu a presença de *Vibrio parahaemolyticus* no trato intestinal dos animais, mas, no entanto, não contribuiu para o desempenho zootécnico dos camarões. Os mesmos autores ainda sustentam que o *L. plantarum* é uma bactéria isolada do trato intestinal de *L. vannamei* e pode apresentar melhor adaptação nesse ambiente, modificando a microbiota intestinal, inibindo diferentes patógenos, como também foi registrado por Leyva-Madrigal et al. (2011), usando bactérias ácidas lácticas como componente da dieta ofertada a *L. vannamei*.

Quanto ao estresse causado pela temperatura, não houve diferença significativa entre os grupos. No entanto, o grupo alimentado com a dieta *U. ohnoi* apresentou 77,5 % de sobrevivência, enquanto no grupo que recebeu a dieta sem os aditivos (controle) foi registrada sobrevivência igual a 62,5 % ao final do ensaio (48 h). Após o choque térmico foi observado que em todos os grupos houve queda no número de sobreviventes na primeira hora pós-estresse, comportamento similar ao observado por Pontinha et al. (2018). No entanto, os percentuais de sobrevivência final observado no grupo alimentado com a dieta *U. ohnoi* podem indicar um efeito positivo da inclusão dessa alga na resistência ao estresse térmico por baixa temperatura. Esse efeito poderia estar associado ao conteúdo lipídico, ou à presença de compostos bioativos presentes em *U. ohnoi*, sugerindo que análises com o objetivo de avaliar o perfil desses compostos poderiam ser realizadas, bem como a avaliação da inclusão dessa alga na dieta em um percentual distinto do aqui utilizado.

Estudos com *L. vannamei* desafiados ao frio ($11,5 \pm 0,1$ °C) conduzidos por Schleder et al. (2017), indicam o aumento da resistência ao choque térmico desta espécie com base na suplementação alimentar com 0,5 % de biomassa seca obtida da alga parda *Sargassum filipendula* ao apresentarem baixa taxa de mortalidade (3%) em relação ao grupo alimentado com a dieta sem adição da alga (dieta controle) (20 %). Tal resistência poderia ser explicada devido, dentre outras respostas, ao aumento da fluidez da membrana em hemócitos de camarões alimentados com 0,5% de *S. filipendula* após choque térmico. Contudo, de acordo com as análises de Pontinha et al. (2018), provavelmente o limite de tolerância de *L. vannamei* ao estresse térmico está entre 11,5 °C e 13 °C, corroborando com Wyk; Scarpa (1999), que indicam ser o limite letal inferior aproximadamente 15 °C, embora o camarão possa sobreviver a

temperaturas mais frias por um curto período. Temperaturas críticas já foram registradas em tanques de cultivo de *L. vannamei* em Santa Catarina, onde houve o registro pontual de 14 °C como temperatura mínima no período da manhã no mês de abril de 1999, tendo sido a temperatura média naquele mês igual a 20 °C (COSTA et al., 2000). A temperatura nos tanques de cultivo em Santa Catarina foi incluída entre um estudo voltado à análise dos parâmetros físico-químicos dos cultivos (no período entre 2008 e 2009) nas fazendas do estado afetadas pelo WSSV (COSTA et al., 2010).

De acordo com Wyk; Scarpa (1999), a temperatura ótima para o cultivo de *L. vannamei* está compreendida na faixa de 28 a 32 °C e a sobrevivência ocorre na faixa de 15 a 35 °C. As diferentes fases de cultivo e o sistema de criação empregados apresentam variações de temperatura, como apontam Maia et al. (2012) e, sendo os crustáceos pecilotérmicos, ou seja, sujeitos às flutuações do meio onde se encontram, sua atividade metabólica e sobrevivência são determinadas principalmente pela temperatura. A variação diária da temperatura nunca deve ultrapassar os 4 °C, sendo a flutuação deste parâmetro estressante para os camarões (WYK; SCARPA, 1999).

Para Abdel-Rahim et al. (2021), a utilização da alga marrom, *Sargassum polycystum* em conjunto com nucleotídeos foi capaz de atuar na resistência de *L. vannamei* também submetido a estresse térmico (abaixo de 16 °C), apresentando não apenas taxa elevada de sobrevivência ao estresse, com 84 % de sobrevivência, como também foi possível registrar efeito sinérgico da dieta combinada, pois os aditivos foram capazes de melhorar o desempenho zootécnico, a resposta imune, além de regulação positiva de proteínas, dentre elas, a proteína do choque térmico HSP70.

A temperatura da água é o mais comum fator de estresse, influenciando praticamente quase todos os processos bioquímicos e fisiológicos em crustáceos. Outras respostas moleculares impactadas pelo estresse térmico em *Litopenaeus vannamei* frente a baixa temperatura (16°C) envolvem classicamente o metabolismo energético, mais especificamente a fosforilação oxidativa, além dos lisossomos e ribossomos, conforme apontado através de análise proteômica (PENG et al., 2018), bem como as defesas antioxidantes (XU et al., 2018), e o metabolismo de lipídeos, esse último afetando, em particular, a fluidez das membranas celulares (REN et al., 2021).

Evidencia-se que os camarões que receberam a dieta contendo a macroalga *Ulva ohnoi* apresentaram peso final de 12,32 g, sendo este, o grupo com menor peso entre os grupos avaliados ao final do estudo. Conforme observado por Alencar; Junior; Celino (2010), médias de pesos equivalentes a 9,04 g ± 1,19 e 8,80 g ± 1,13, também foram observados para os

tratamentos com a alga *U. lactuca* e na dieta controle, respectivamente, para camarão branco do pacífico cultivado por 51 dias, período de cultivo superior ao realizado em nosso estudo. Já para Anaya-Rosas et al. (2019) exemplares de *L. vannamei* alimentados (durante 30 dias) com diferentes tratamentos alimentares contendo algas *Gracilaria vermiculophylla*, *Dictyota dichotoma* e *Ulva lactuca*, separadamente, encontraram diferença significativa no peso final dos animais que receberam as dietas com as duas últimas algas (3,30 g e 3,18 g, respectivamente). Quanto a porcentagem da biomassa seca de algas adicionadas à ração fornecida a espécie em questão, Pallaoro; Vieira; Hayashi (2016) destacam que *L. vannamei* apresenta preferência por *Ulva lactuca* quando expostos a outras algas (*Gracilaria domingensis* e *Sargassum cymosum*) e em substituição à ração comercial por *U. lactuca* (em quatro porcentagens de biomassa: 25, 50, 75 e 100 %). Os autores observaram ainda que tal substituição, em até 50% da alga verde *U. lactuca* sobre ração comercial, não interfere no desempenho do crescimento dessa espécie de camarão.

Niu et al. (2018) apontam que os efeitos das dietas fornecidas com farinha de algas marinhas no crescimento dos camarões variam com o tipo de alga e o nível de inclusão testado. No presente estudo, exemplares de *L. vannamei* receberam dietas contendo 2% de biomassa seca da macroalga *U. ohnoi*, e não apresentaram diferenças significativas no ganho de peso semanal, no peso semanal e na sobrevivência dos animais das diferentes dietas formuladas. Vizcaíno et al. (2020) apontam que apesar dos benefícios das algas marinhas como ingrediente dietético para algumas espécies de peixes, alguns estudos descreveram que o nível de inclusão alimentar de algas acima de 20% produz efeitos prejudiciais no crescimento dos peixes e em outros parâmetros zootécnicos. Desta forma, observamos que a macroalga *Ulva ohnoi* não contribuiu conforme o esperado para o ganho de massa do camarão branco do pacífico, uma vez que no presente estudo a inclusão de 2% de biomassa seca de *U. ohnoi* como dieta formulada não refletiu de forma significativa no desempenho zootécnico dos animais avaliados.

De acordo com Moss (1994), é possível que espécies de macroalgas não possam ser prontamente assimiladas por causa de suas paredes celulares ricas em polissacarídeos, de forma que a microbiota intestinal associada aos camarões peneídeos mostra capacidade limitada de hidrolisar esses polímeros estruturais, incluindo celulose. Vizcaíno et al. (2020) relatam a presença de fatores antinutricionais (FAN) em *Ulva ohnoi*. Tais fatores apresentam potencial efeito inibitório sobre proteases digestivas de peixes, sendo capazes de reduzir a atividade proteolítica digestiva de diferentes espécies de peixes marinhos. Ainda sobre os fatores antinutricionais (como lectinas, inibidores de protease, goitrogênios, alérgenos, antivitaminas, saponinas, taninos, fitato e toxinas), Silva et al. (2015) apontam que tais fatores são amplamente

distribuídos em plantas e algas, e vários efeitos negativos causados por sua incorporação em dietas de peixes têm sido relatados.

Corral-Rosales (2018), destacam que a *Ulva* sp. não é rica em proteínas e sendo administrada em dose muito baixa, não fornece quantitativamente mais proteína em relação à dieta controle. O que provavelmente revelou o efeito não esperado nos camarões alimentados com a dieta que continha biomassa seca de *U. ohnoi* do presente estudo. Em contrapartida, mas de forma a contribuir com nossos achados para a dieta contendo *U. ohnoi*, a obtenção de proteínas dessa alga pode ser um desafio, pois parte destas macromoléculas podem ser encontradas como parte da membrana celular, o que explica a dificuldade na extração de proteínas de algas, levando, provavelmente a um baixo rendimento (LOURENÇO et al., 2002), assim como a redução na assimilação destas por parte do organismo. De acordo com Kazir et al. (2019), o rendimento das proteínas isoladas do total de proteínas de algas é de apenas 10 % para *Ulva* sp. Além disso, Chater et al. (2015) destacam que as fibras dietéticas solúveis e formadoras de gel podem reduzir a absorção intestinal de outros fatores dietéticos.

Lahaye; Robic (2007) destacam que os mecanismos pelos quais a ulvana (principal polissacarídeo extraído da parede de *Ulva* sp.) e unidades de construção são sintetizadas, montadas, exportadas e integradas na parede celular da alga influenciará a extração e propriedades dos polissacarídeos. Muitos compostos ativos são derivados de microrganismos ou de algas, Cantelli (2009) destaca que alguns destes compostos, dentre eles, os polissacarídeos sulfatados podem gerar imunoestimulação em camarões. De acordo com Evans; Critchley (2014), a estrutura complexa dos polissacarídeos associados às algas marinhas atua sinergicamente quando incorporados às dietas, além disso, cada polissacarídeo apresenta uma atividade prebiótica. Entretanto, análises para avaliar o sinergismo dos aditivos não foram realizadas.

Além das análises relacionadas ao desempenho zootécnico frente às dietas formuladas, a condição sanitária de *L. vannamei* também foi investigada. Desta forma, sendo o IHHNV um patógeno viral não letal, frequentemente encontrado em populações de *L. vannamei*, podendo acarretar crescimento heterogêneo e, potencialmente, deformidades no exoesqueleto dependendo do grau de infecção, buscou-se avaliar a eventual presença deste vírus na população de camarão branco do Pacífico no presente estudo. Nossos resultados indicaram a presença do IHHNV nos camarões em todos os grupos. O percentual da ocorrência natural do vírus foi igual a 50 e 55 % nos grupos das dietas controle (sem aditivos) e probiótico *L. plantarum*, enquanto para os animais alimentados com as dietas alga e alga + probiótico, esse percentual foi de 60 e 78 %, respectivamente.

Nossos achados são inferiores aos encontrados Leyva-Madrigal et al. (2011), que ao fornecer dietas contendo bactérias ácido-láticas, encontraram prevalência de 100 % de IHHNV em exemplares de *L. vannamei*, enquanto no grupo controle a prevalência do vírus foi de 83,3 %. O mesmo estudo ainda associou a redução da ocorrência do WSSV em camarão branco do pacífico frente a alimentação com probióticos, com base na diminuição dos percentuais de detecção do patógeno causador da mancha branca, de 16,6 para 8,3 %.

Nos grupos dos animais alimentados com as dietas formuladas e estressados termicamente, os percentuais de ocorrência do IHHNV foram de 60 e 75 % para os grupos controle e grupo alga, respectivamente. Para os animais alimentados com a dieta probiótico e com a dieta A + P esse percentual foi de 85 % para ambos. LEYVA-MADRIGAL et al. (2011), relatam que bactérias ácido-láticas não apresentam efeito benéfico contra este vírus, corroborando nossos resultados, uma vez que os animais que receberam a dieta contendo o aditivo probiótico, apresentaram comparativamente um percentual alto de ocorrência do patógeno, inclusive após o estresse térmico. Por outro lado, Yang et al. (2020) mencionam que a tripsina-1 no camarão *L. vannamei* juvenil é regulada negativamente após a infecção por IHHNV. Tal condição afeta a função digestiva e, por sua vez, afeta o crescimento do camarão na fase juvenil.

Para estimar o crescimento e avaliar o estado nutricional de organismos aquáticos, Tu et al. (2010) sugerem o uso do índice de condição fisiológica, através da razão de ácidos nucleicos (RNA/DNA). Nossas análises em relação ao índice de condição fisiológica (RNA/DNA) e as dietas experimentais indicaram que os animais que receberam diferentes dietas apresentaram diferenças significativas entre essas razões. Os maiores índices de RNA/DNA foram observados nos grupos alga e no grupo alimentado com a dieta combinada alga + probiótico, o que pode representar o efeito simultâneo destes aditivos no metabolismo dos camarões. Segundo Buckley et al. (2008), razões elevadas de RNA/DNA podem indicar melhores condições fisiológicas, pois podem refletir mais maquinaria molecular (potencial) para a síntese de proteínas.

Moss (1994), ao avaliar as concentrações e razões RNA/DNA de *L. vannamei* alimentados com diferentes dietas (micro e macroalgas), observaram, após cinco dias, que animais mantidos sem alimentação, animais que receberam a dieta com microalga *Nannochloropsis oculata*, a dieta contendo a macroalga *Ulva* sp. e a dieta com macroalga *Enteromorpha* sp. apresentaram razões RNA/DNA similares ou inferiores ($3,84 \pm 0,17$; $3,73 \pm 0,17$; $4,16 \pm 0,21$; $4,37 \pm 0,18$, respectivamente) às observadas para os camarões que foram alimentados com dieta comercial ($6,15 \pm 0,22$) e dieta composta principalmente pela

diatomácea *Chaetoceros* sp. ($6,01 \pm 0,49$), os quais obtiveram o maior peso ao final do ensaio. Em contrapartida ao achado para a macroalga *Ulva* sp. utilizada por Moss (1994), nossos estudos indicaram haver uma maior razão de ácidos nucleicos para o grupo de *L. vannamei* alimentado com *Ulva ohnoi* (dieta alga) e com a dieta combinada *U. ohnoi* + *L. plantarum* (alga + probiótico).

Lordan; Ross; Stanton (2011) ressaltam que a digestibilidade *in vivo* das proteínas de algas é pouco descrita. No entanto, os mesmos autores, enfatizam que estudos têm descrito uma alta taxa de degradação de proteínas de algas *in vitro* por enzimas proteolíticas como pepsina, pancreatina e pronase. As condições ecofisiológicas de crescimento também podem afetar a biossíntese do polissacarídeo ulvana e, portanto, sua química.

Entretanto, Hufnagl; Temming (2018) afirmam que existem vários fatores (para os camarões, esses fatores são mais prováveis de muda, maturação e alimentação) que podem influenciar a razão RNA/DNA, mas não o crescimento. Ressalta-se que para o presente estudo, a macroalga foi coletada no verão, e como apontam Lahaye; Robic (2007), a sazonalidade pode refletir variações nos teores de carboidratos, em diferentes proporções de amido ou outros polissacarídeos da parede celular, como como glucuronano, xiloglucano, ou algumas glicoproteínas co-extraídas com ulvana.

Estes fatores podem influenciar em uma variedade de processos bioquímicos, como por exemplo, aqueles associados ao nível de RNA, provavelmente relacionados, por exemplo, com a elevação do nível de hormônios da muda, ou para orientar a maturação das gônadas. Ambos os processos aumentarão as razões RNA/DNA, embora o crescimento possa não ser afetado, ou mesmo influenciado negativamente (HUFNAGL; TEMMING, 2018). Nosso estudo não envolveu a análise do índice de condição fisiológica durante as fases pré e pós muda, o que contribuiria para melhor avaliar os resultados encontrados, uma vez que o RNA regula a produção de enzimas e hormônios e, portanto, alterações na concentração de RNA que provavelmente ocorrem durante a muda.

A relação RNA/DNA é baseada na suposição que o conteúdo de RNA por célula varia com o crescimento, uma vez que, o RNA serve tanto como molde quanto como organizador para a síntese de proteínas. Além disso, supõe-se que o conteúdo de DNA por célula seja constante em células somáticas normais dentro de uma determinada espécie, e essa quantidade não é alterada pela fome ou outros estresses (TU et al., 2010).

De acordo com Heilmayer et al. (2008), a razão RNA/DNA é um indicador bioquímico de estresse celular. Em nosso estudo, ao submeter *L. vannamei* a estresse térmico, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos. Cabe ressaltar que as razões foram

extremamente inferiores aos valores encontrados para os animais que não passaram por estresse. *Crassostrea virginica* ao ser submetida a estresses (temperatura e salinidade) apresentam maiores relações RNA/DNA (em brânquias), as quais foram consideradas benéficas. Tais razões foram observadas em salinidades acima de 10 ppm e temperaturas abaixo de 22,5 °C, devido ao menor estresse relacionado à salinidade e temperatura (HEILMAYER et al., 2008). A diminuição nas razões RNA/DNA ocorreu em temperaturas acima de 25 °C, sendo que em nosso estudo isso foi observado em animais submetidos à temperatura de 11,5 °C, seguido de transferência para tanques com água a 28 °C durante 48h. Heilmayer et al. (2008) justificam que um declínio na razão RNA/DNA é indicativo de estresse no nível celular e fornece uma medida complementar para toda a resposta animal ao estresse, derivado da medida do índice de condição corporal (*Body Condition Index* - BCI). Assim, o índice de condição fisiológica, avaliado através da razão RNA/DNA, reflete o nível de atividade metabólica e pode ser usado como índice tanto do estado nutricional, quanto das taxas de crescimento de um organismo (COSTA; GOROKHOVA; KYLE, 2002; YASUMARU; LEMOS, 2010; TEMMING, 2018; ANGELO et al., 2021; STERZELECKI et al., 2021).

Os índices de condição fisiológica também foram utilizados como forma analítica de avaliação para os animais positivos e negativos para o vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética - IHHNV. De forma similar à análise realizada por Kim et al. (2017), ao avaliarem como *L. vannamei* e *Fenneropenaeus chinensis* expressavam fisiologicamente as concentrações e razões RNA/DNA em graus clínicos (estágios) das infecções por *Vibrio* sp. e WSSV. Cabe ressaltar, no entanto, que a metodologia destes autores para obtenção da razão RNA/DNA, difere daquela utilizada em nosso estudo. Para a análise comparativa do índice de condição fisiológica e indivíduos positivos e negativos para o vírus IHHNV não foram encontradas diferenças significativas.

De acordo com Kim et al. (2017), a razão RNA/DNA de *L. vannamei* saudável (estágio sem infecção por *Vibrio* sp. e WSSV) apresentou uma relação significativamente maior de $2,31 \pm 0,10$ em comparação com os estágios I – pequenas manchas brancas na carapaça e comportamento normal ($1,87 \pm 0,23$) e II – manchas brancas distribuídas na metade da área da carapaça ($1,82 \pm 0,18$). Deste modo, Kim et al. (2017) concluíram que o sinal precoce de manchas brancas nos exoesqueletos não indica imediatamente uma diminuição das condições fisiológicas do camarão e não pode ser usado como um indicador para avaliar a saúde deste decápodo.

Em nosso estudo o número amostral entre os camarões positivos e negativos para a presença do IHHNV foram díspares. Embora tais diferenças tenham sido observadas dentro de

grupos de uma mesma dieta, não houve reflexo na razão dos ácidos nucleicos, sendo praticamente iguais entre amostras positivas e negativas para IHHNV. Desta forma, o *L. vannamei* pode conviver de forma harmônica com o IHHNV, uma vez que este camarão é tolerante a este vírus e não afeta sua sobrevivência, embora possa causar perdas significativas na produção, visto que em sua forma patológica causa redução no crescimento corporal de seu hospedeiro, como apontam López-Téllez et al. (2019).

O estresse oxidativo avaliado por meio dos níveis de peroxidação lipídica indicou diferenças nos grupos alimentados com as dietas formuladas, enquanto para o tratamento de estresse térmico não houve diferenças. Entretanto, o estresse térmico afetou significativamente os camarões que receberam a dieta contendo os aditivos, demonstrando que não houve efeito protetivo da dieta combinada, como esperado.

Níveis reduzidos de TBARS em pós-larvas de *L. vannamei* foram observados após a inclusão de 5 e 10 % da fruta amazônica *Mauritia flexuosa* (buriti), quando comparados ao grupo de camarões alimentados com a dieta controle (1,25 e 2,50% de inclusão de buriti) (SIMIÃO et al., 2022), revelando o potencial efeito do quimioprotetor contra o dano oxidativo dessa espécie vegetal. Efeito protetor também foi observado em *L. vannamei* alimentados com a inclusão de 10 % da polpa liofilizada de açaí, *Euterpe oleracea* (SCHMITZ et al., 2020). De acordo com os resultados desse trabalho, ocorreu redução do conteúdo de TBARS no hepatopâncreas dos animais que receberam a dieta contendo açaí. Schmitz et al. (2020) mencionam ainda que a *E. oleracea* oferece diversos benefícios à saúde humana devido à alta quantidade de moléculas antioxidantes, induzindo maior *status* antioxidante, e ainda maior resiliência para lidar com condições estressantes; uma resposta que indica a ação quimioprotetora dessas moléculas bioativas.

Lin; Mui (2017) compararam o efeito da substituição parcial (25%) da proteína de farinha de peixe por farelo de soja e farelo de soja fermentado (contendo *Lactobacillus* spp.) na ração fornecida para o camarão branco do pacífico, *Litopenaeus vannamei*. Os resultados revelaram que o grupo da dieta contendo farelo de soja ($629,91 \pm 10,13$) teve o maior valor hepatopancreático de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, seguido pelo grupo contendo o farelo de soja fermentado ($512,03 \pm 21,87$), enquanto o menor no valor foi observado no grupo alimentado com a dieta controle ($268,79 \pm 17,26$). Tais efeitos também foram observados em nosso estudo, uma vez que os animais alimentados com a dieta sem aditivos (controle) apresentaram os menores valores de TBARS, enquanto os camarões que receberam a dieta alga *U. ohnoi* apresentaram elevados níveis de dano oxidativo, o que pode ter acontecido devido ao malondialdeído (MDA) ser um produto de oxidação secundária de ácidos graxos

poliinsaturados (LIN; MUI, 2017), componente comum na parede de algas marinhas (CUNHA; GRENHA, 2016).

Valores elevados de TBARS têm sido relatados como indicadores promissores para avaliar o estresse oxidativo (KATYA et al., 2010). Deste modo, de acordo com Lin et al. (2003), muitos fatores podem influenciar a extensão da peroxidação lipídica das membranas biológicas entre as espécies, ou seja, para além da especificidade da espécie, a composição de ácidos graxos dos lipídios da membrana pode ser a principal razão responsável pela diferente suscetibilidade da membrana ao dano por peroxidação.

De acordo com Ruvalcaba-Márquez et al. (2021), as espécies reativas de oxigênio podem interagir com diferentes macromoléculas, incluindo lipídios, DNA e proteínas, causando alterações estruturais e induzindo danos celulares. Os autores ainda enfatizam que as proteínas animais são preferíveis na dieta do camarão devido à sua alta digestibilidade e perfil de aminoácidos superior em comparação com as proteínas vegetais. Independente das características da composição proteica, o conteúdo lipídico pode ter gerado o dano observado nos camarões alimentados com a dieta combinada utilizando 2 % de biomassa seca de *Ulva ohnoi* com adição do probiótico *Lactobacillus plantarum*.

Análise similar envolvendo a razão RNA/DNA de amostras de indivíduos positivos e negativos para IHHNV em *L. vannamei* também foi realizada no caso da peroxidação lipídica. No entanto, ao analisar estatisticamente, não foi encontrada diferença entre as amostras das dietas formuladas, e também entre aquelas do estresse térmico. Mas de forma comparativa, o nível de TBARS de amostras positivas e negativas apresentaram um padrão nos resultados, ou seja, animais infectados ou não com IHHNV, expressam o produto final da peroxidação lipídica de forma similar. É importante destacar que a infecção pelo IHHNV pode induzir alterações na resposta imune, na taxa de crescimento e em processos de metabolismo (da glutatona, de ácidos graxos e de alguns aminoácidos, por exemplo) em camarões (YANG et al. 2022).

Como já destacado, as algas e os probióticos têm sido aplicados no setor aquícola como aditivos alimentares a fim de aumentar o desempenho zootécnico, fortalecer o sistema imune, além de conferir boas condições ao meio, uma vez que estes podem ser considerados fitorremediador (para algas) e biorremediador (no caso do probiótico). É importante salientar que embora as algas estejam presentes na atividade aquícola há muitos anos, Kazir et al. (2019) relatam que atualmente ainda pouco se sabe sobre as propriedades funcionais das proteínas de macroalgas e sua digestibilidade, tornando-se então fontes futuras de pesquisas para a aquicultura. Além disso, Mezghani et al. (2013), relatam que as variações nos teores de proteína

e açúcar podem ser atribuídas a fatores como clima, local de origem da alga, período de coleta das algas, diferenças de espécies e método de extração.

2.5 CONCLUSÕES

- a) Os aditivos alimentares macroalga *Ulva ohnoi* e o probiótico *Lactobacillus plantarum* fornecidos (combinados e separadamente) ao camarão marinho *Litopenaeus vannamei* durante 45 dias não apresentaram efeitos significativos frente aos parâmetros zootécnicos, sendo similares aos animais alimentados com a dieta controle (sem aditivos).
- b) Embora, estatisticamente, não tenha sido observada diferença na sobrevivência dos grupos alimentados com as dietas experimentais, pôde ser observado que no grupo de camarões que recebeu a dieta contendo biomassa seca de *U. ohnoi* a sobrevivência foi superior àquela dos animais do grupo controle, após o estresse térmico.
- c) O índice de condição fisiológica, analisado através da razão RNA/DNA, foi estatisticamente diferente para animais alimentados com diferentes dietas ao longo de 45 dias. Foi possível observar valores elevados dos indivíduos alimentados com as dietas alga e dieta combinada alga + probiótico, indicando boas condições para síntese de proteínas e crescimento somático frente à adição de *U. ohnoi* na dieta.
- d) Em relação à peroxidação lipídica, as respostas às dietas contendo os aditivos alimentares conferiram baixa proteção ao dano oxidativo, sendo os grupos das dietas alga e dieta alga + probiótico, relativamente superiores aos demais (dieta controle e dieta probiótico). Contudo, estudos relatam a potencial capacidade antioxidante de macroalgas do gênero *Ulva* sp., o que não foi possível observar no presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHIM, M. et al. Dietary supplementation of brown seaweed and/or nucleotides improved shrimp performance, health status and cold-tolerant gene expression of juvenile whiteleg shrimp during the winter season. **Marine Drugs**, v.19, 2021
- AKHTER, N. et al. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 733–741, 2015.
- ALENCAR, J. R.; JUNIOR, P. A. H.; CELINO, J. J. Cultivo de Camarão Branco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) com a Macro-alga *Ulva Lactuca* Linneaus (Chlorophyta) no

Tratamento de Efluentes em Sistema Fechado de Recirculação. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 10, 2010;

ALMEIDA, E. A. et al. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 135, n. 3, p. 295–303, 2003;

ANAYA-ROSAS, R. E. et al. Effects of a co-culture of marine algae and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on the growth, survival and immune response of shrimp infected with *Vibrio parahaemolyticus* and white spot virus (WSSV). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 87, p. 136–143, 2019;

AOAC – Association of Official Agricultural Chemists. 2005. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18th ed. Maryland, USA: AOAC International. 1094p, 2005;

BARDERA, G. et al. The importance of behaviour in improving the production of shrimp in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 4, p. 1104–1132, 2019;

BASTOS, E. et al. Phytoremediation potential of *Ulva ohnoi* (Chlorophyta): Influence of temperature and salinity on the uptake efficiency and toxicity of cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 334–343, 2019;

BOLÍVAR-RAMÍREZ, N. C. et al. Performance of pacific white shrimp fed probiotics *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* spp. in a biofloc system. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 47, p. 652, 2021;

BUCKLEY, L.; CALDARONE, E.; CLEMMESSEN, C. Multi-species larval fish growth model based on temperature and fluorometrically derived RNA/DNA ratios: results from a meta-analysis. **Marine Ecology Progress Series**, v. 371, p. 221–232, 2008;

CANTELLI, LIEGE. **Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria birdiae* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)**. 2009. 68 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC;

CÁRDENAS, J. V. et al. Assessment of different levels of green and brown seaweed meal in experimental diets for whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone) in recirculating aquaculture system. **Aquaculture International**, v. 23, p. 1491–1504, 2015;

CHATER, P. I. et al. The impact of dietary fibres on the physiological processes governing small intestinal digestive processes. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6, n. 2, p. 117–132, 2015;

CORRAL-ROSALES, D. C. et al. Modulation of reproductive exhaustion using *Ulva clathrata* in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) broodstock during commercial maturation. **Aquaculture Research**, v. 49, p. 3711–3722, 2018;

COSTA, S. W. et al. Parâmetros de cultivo e a enfermidade da mancha branca em fazendas do estado de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.1521-1530, 2010.

- COSTA, S. W. et al. Resultados técnico-econômicos do cultivo do camarão *litopenaeus vannamei* no Estado de Santa Catarina – Brasil. Relatório do CEDAP/EPAGRI, 2000. Disponível em: https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_epagri/Cedap/Trabalho-Evento/16-Trab_evento-maricultura-camarao-gestao.pdf;
- COSTA REZENDE, P. et al. Brown seaweeds added in the diet improved the response to thermal shock and reduced *Vibrio* spp. in pacific white shrimp post-larvae reared in a biofloc system. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 6, p. 2852–2861, 2021;
- CUNHA, L.; GRENHA, A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery Applications. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, p. 42, 2016;
- DU, Y. et al. The influence of surface proteins on the probiotic effects of *Lactobacillus pentosus* HC-2 in the *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 92, p. 119–124, 2019;
- EVANS, F. D.; CRITCHLEY, A. T. Seaweeds for animal production use. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 891–899, 2014;
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. **The state of world fisheries and aquaculture 2022: Towards blue transformation**. Rome. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/cc0461en>. Acesso em: 22 ago. 2022;
- GONG, H. et al. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* II. Active components of soybean lecithin. **Aquaculture**, v. 190, p. 325-342, 2000;
- GOROKHOVA, E. KYLE, M. Analysis of nucleic acids in *Daphnia*: development of methods and ontogenetic variations in RNA-DNA content. **Journal of Plankton Research**, v. 24, n. 5, p. 511–522, 2002;
- HEILMAYER, O. et al. Stress tolerance of a subtropical *Crassostrea virginica* population to the combined effects of temperature and salinity. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 79, p. 179-185, 2008;
- HINDU, S. V. et al. A review on the impact of seaweed polysaccharide on the growth of probiotic bacteria and its application in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 27, n. 1, p. 227–238, 2019;
- HUFNAGL, M.; TEMMING, A. Are the RNA:DNA ratio and dry-weight-at-length suitable growth proxies for brown shrimps (*Crangon crangon*)? **Scientia Marina**, v. 82, n. 1, p. 43, 2018;
- KAPLAN, L. A. E.; LEAMON, J.; CRIVELLO, J. F. The Development of a Rapid and Sensitive, High-Through-Put Protocol for RNA:DNA Ratio Analysis. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 13, p. 276-279, 2001;
- KATYA, K. et al. Efficacy of inorganic and chelated trace minerals (Cu, Zn and Mn) premix sources in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed plant protein based diets. **Aquaculture**, v. 459, p. 117–123, 2016;
- KAZIR, M. et al. Extraction of proteins from two marine macroalgae, *Ulva* sp. and *Gracilaria* sp., for food application, and evaluating digestibility, amino acid composition and antioxidant properties of the protein concentrates. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 194–203, 2019;

- KIM, S. K. et al. Relationship between White Spot Symptom and Physiological Status of Two Penaeid Shrimps. **Environmental Biology Research**, v. 35, n. 4, p. 461–467, 2017;
- KLONGKLAEW, N. et al. Antibacterial and antiviral activities of local thai green macroalgae crude extracts in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Marine Drugs**, v. 18, n. 3, p. 140, 2020;
- KRUMMENAUER, DARIANO. **Estratégias para o cultivo de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) no extremo sul do Brasil**. 2008. 60 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul-RS;
- LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1765–1774, 2007;
- LEGARDA, E. C. et al. Effects on fatty acids profile of *Seriola dorsalis* muscle tissue fed diets supplemented with different levels of *Ulva fasciata* from an Integration Multi-Trophic Aquaculture system. **Aquaculture**, v. 535, 2021;
- LEYVA-MADRIGAL, K. Y. et al. Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions. **Aquaculture**, v. 322–323, p. 16–22, 2011;
- LIN, Y. H.; MUI, J.J. Comparison of dietary inclusion of commercial and fermented soybean meal on oxidative status and non-specific immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 63, p. 208–212, 2017;
- LIN, Y. R.; HUANG, S. L; HUANG, C. H. Characteristics of NADH-dependent lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, V. 135, P. 683-687, 2003;
- LO, C. F. et al. Detection of baculovirus associated with White spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 25, p. 133-141, 1996;
- LÓPEZ-TÉLLEZ, N. A. et al. History, impact, and status of infectious diseases of the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* (Bonne, 1831) cultivated in Mexico. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 51, n. 2, p. 334–345, 2020;
- LORDAN, S.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. **Marine Drugs**, v. 9, n. 6, p. 1056–1100, 2011;
- LOURENÇO, S. O. et al. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. **Phycological Research**, v. 50, p. 233–241, 2002;
- MAIA, E. DE P. et al. Crescimento, sobrevivência e produção de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema intensivo. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 17, n. 1, 2012;
- MANGOTT, A. et al. *Ulva lactuca* as a functional ingredient and water bioremediator positively influences the hepatopancreas and water microbiota in the rearing of *Litopenaeus vannamei*. **Algal Research**, v. 51, p. 102040, 2020;

- MD ZOQRATT, M. Z. H. et al. Microbiome analysis of Pacific white shrimp gut and rearing water from Malaysia and Vietnam: implications for aquaculture research and management. **PeerJ**, v. 6, p. e5826, 2018;
- MEZGHANI, S. et al. Antioxidant Potential of *Ulva rigida* extracts: protection of HeLa Cells Against H₂O₂ Cytotoxicity. **The Biological Bulletin**, v. 225, n. 1, p. 1–7, 2013;
- MOSER, JULIANA RIGHETTO. **Respostas bioquímicas do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran e determinação da prevalência natural do vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética Infecciosa - IHHNV**. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC;
- MOSER, JULIANA RIGHETTO. **Biomarcadores moleculares no camarão branco, *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda), submetido a estresse ambiental e infectado pelo vírus da síndrome da mancha branca (White Spot Syndrome virus, WSSV)**. 2011. 93 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC;
- MOSS, M. Growth rates, nucleic acid concentrations, and RNA/DNA ratios of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, fed different algal diets. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 182, p. 193-204, 1994;
- NIU, J. et al. Dietary values of macroalgae *Porphyra haitanensis* in *Litopenaeus vannamei* under normal rearing and WSSV challenge conditions: Effect on growth, immune response and intestinal microbiota. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 81, p. 135-149, 2018;
- NRC. National Research Council. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington, D. C.: The National Academies Press, 2011;
- PALLAORO, M. F.; VIEIRA, F. N.; HAYASHI, L. *Ulva lactuca* (Chlorophyta Ulvales) as co-feed for Pacific white shrimp. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 6, p. 3659–3665, 2016;
- PANUTRAKUL, S.; SENANAN, W. Abundance of introduced Pacific whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) along the east coast of Thailand. **Aquatic Invasions**, v. 16, n. 4, p. 750–770, 2021;
- PENG, J. X. et al. Proteomic responses under cold stress reveal unique cold tolerance mechanisms un the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Frontiers in Physiology**, v.9, p.1399, 2018;
- PINOARGOTE, G. et al. Effects on survival and bacterial community composition of the aquaculture water and gastrointestinal tract of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to probiotic treatments after an induced infection of acute hepatopancreatic necrosis disease. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 10, p. 3270–3288, 2018;
- PONTINHA, V. A.; VIEIRA, F. N.; HAYASHI, L. Mortality of pacific white shrimp submitted to hypothermic and hyposalinic stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 2, p. 310–310, 2018;
- PRABHU, M. et al. Starch from the sea: The green macroalga *Ulva ohnoi* as a potential source for sustainable starch production in the marine biorefinery. **Algal Research**, v. 37, p. 215–227, 2019.

REN, X. et al. Effects of Low Temperature on Shrimp and Crab Physiology, Behavior, and Growth: A Review. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, p. 746177, 2021.

RUVALCABA-MÁRQUEZ, J. C. et al. Performance, immune response, and oxidative stress parameters of *Litopenaeus vannamei* fed diets containing varying carbohydrate/protein, lipid/protein, and energy/protein ratios. **Aquaculture Reports**, v. 21, p. 100771, 2021;

SCHLEDER, D. D. et al. Thermal resistance of Pacific white shrimp fed *Sargassum filipendula*: A MALDI-TOF mass spectrometry approach. **Aquaculture**, v. 481, p. 103–111, 2017;

SCHLEDER, D. D. et al. Impact of combinations of brown seaweeds on shrimp gut microbiota and response to thermal shock and white spot disease. **Aquaculture**, v. 519, p. 734-779, 2020;

SCHMITZ, M. J. et al. Modulation of nodularin toxicity in shrimp *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) fed with dietary açai (*Euterpe oleracea*) inclusion. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 103, p. 464-471, 2020;

SILVA, D. M. et al. Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 4, p. 1671–1680, 2015;

SIMIÃO, C. S. et al. Chemoprotection of amazonian *Mauritia flexuosa* fruit pulp against ammonia and nitrite toxicity to postlarvae shrimps *Litopenaeus vannamei*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 48. 2022;

SOUSA, D. R. L. et al. Doença da mancha branca do camarão cinza (*Litopenaeus vannamei*). **Revista Científica de Medicina Veterinária da UNICEPLAC**, v.5, n.1, p. 131-151, 2019;

SOUZA VALENTE, C. et al. White spot syndrome virus (WSSV) disturbs the intestinal microbiota of shrimp (*Penaeus vannamei*) reared in biofloc and clear seawater. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 18, p. 8007–8023, 2020a.

TU, H. T. et al. Effects of pesticides and antibiotics on penaeid shrimp with special emphases on behavioral and biomarker responses. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 929–938, 2010;

VARO, I. et al. Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings. **Aquatic Living Resources**, v. 20, p. 263–270, 2007;

VIEIRA, F. N. et al. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 6, p. 763–769, 2008;

VIZCAÍNO, A. J. et al. Evaluation of *Ulva ohnoi* as functional dietary ingredient in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects on the structure and functionality of the intestinal mucosa. **Algal Research**, v. 42, p. 101608, 2019;

VIZCAÍNO, A. J. et al. Partial characterization of protease inhibitors of *Ulva ohnoi* and their effect on digestive proteases of marine fish. **Marine Drugs**, v. 18, 2020;

- XU, Z. et al. The oxidative stress and antioxidant responses of *Litopenaeus vannamei* to low temperature and air exposure. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 72, p. 564–571, 2018;
- WHETSTONE, J. M. et al. **Opportunities and Constraints in Marine Shrimp Farming**. Southern Regional Aquaculture Center. 2002;
- WYK, P. V.; SCARPA, J. **Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems**. Water Quality Requirements and Management. p. 229, 1999;
- YANG, N. et al. Transcriptome analysis of IHHNV infection in *Penaeus vannamei* at different developmental stages. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 127, p. 329–339, 2022;
- ZHOU, Q. C. et al. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 364–365, p. 252–258, 2012;

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Sendo este o primeiro trabalho de avaliação de respostas bioquímicas do uso da macroalga *Ulva ohnoi* como aditivo alimentar, de forma isolada e combinada com o probiótico *Lactobacillus plantarum* para *L. vannamei*, mais estudos deverão ser realizados a fim de ampliar a compreensão sobre a contribuição destas dietas e sua aplicabilidade efetiva para a carcinicultura.

Assim, estudos avaliando diferentes porcentagens de incorporação da *Ulva ohnoi* na ração, bem como avaliação de formas eficazes de obtenção dos compostos bioativos presentes nesta macroalga, seriam interessantes. Dessa forma, seria possível ofertar aos animais, não apenas a biomassa seca, mas eventualmente os principais constituintes da alga separadamente, como por exemplo, ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFA), proteínas, incluindo aquelas presentes na membrana celular, polissacarídeos sulfatados, dentre outros.

Avaliar as defesas antioxidantes de natureza enzimática, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) e, além daquelas não enzimáticas, como por exemplo, os níveis do peptídeo glutathione (GSH), seria também uma abordagem relevante na continuidade do presente trabalho.

Considerando o estresse térmico, a avaliação dos níveis da proteína de choque térmico HSP70, bem como da indução da transcrição do gene que a codifica seriam outras abordagens relevantes, uma vez que ambos podem ser considerados como um biomarcadores de mudanças na atividade metabólica celular, de proteção contra efeitos proteotóxicos, de alerta do sistema imunológico no camarão branco do Pacífico; biomarcadores esses com potencial de aplicação na carcinicultura, possibilitando melhor explorar e avaliar o uso de *U. ohnoi* como aditivo na ração fornecida.

Desta forma, estudos para a extração dos principais compostos da *U. ohnoi* e a avaliação do uso de biomarcadores podem ser considerados como ferramentas-chave para compreender, de forma mais precisa, a dinâmica, em nível bioquímico, dos efeitos da inclusão dessa espécie de alga na dieta do camarão branco do Pacífico, *L. vannamei*, um organismo com expressiva representatividade na carcinicultura mundial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- AKHTER, N. et al. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 733–741, 2015;
- ALMEIDA, E. A. et al. DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 135, n. 3, p. 295–303, 2003;
- AMPARYUP, P.; CHAROENSAPSRI, W.; TASSANAKAJON, A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 990–1001, 2013;
- ANANDA RAJA, R. et al. Pathogenicity profile of *Vibrio parahaemolyticus* in farmed Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 67, p. 368–381, 2017;
- ANAYA ROSAS, R. et al. Antioxidant activity and apparent digestibility of amino acids of three macroalgae meals in the diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 45, n. 5, p. 970–978, 2017;
- ANGELL, A. R. et al. Indirect and direct effects of salinity on the quantity and quality of total amino acids in *Ulva ohnoi* (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 51, n. 3, p. 536–545, 2015;
- ANGELO, M. et al. Temperature influence on the embryogenesis, survival and initial development of *Mugil liza* larvae. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 8, p. 3705–3712, 2021;
- AQUINO, R. S. et al. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, vol. 15, n. 1, p. 11–20, 2005;
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Censo da Carcinicultura do Litoral Norte do Estado do Ceará e Zonas Interiores Adjacentes**. Natal, RN: ABCC/MAPA, 2017. 52 P. Disponível em: < <https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2017/12/CENSO-LITORAL-NORTE.pdf> >. Acesso em: 24 out. 2020;
- BARDERA, G. et al. The importance of behaviour in improving the production of shrimp in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 4, p. 1104–1132, 2019;
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. **Guía Técnica – Patología e Inmología de Camarones Penaeidos**. 2. ed. Panamá: OIRSA, 2014;
- BASTOS, E. et al. Phytoremediation potential of *Ulva ohnoi* (Chlorophyta): Influence of temperature and salinity on the uptake efficiency and toxicity of cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 334–343, 2019;
- BATTISTELLA, S.; BONIVENTO, P.; AMIRANTE, G. A. Hemocytes and immunological reactions in crustaceans. **Italian Journal of Zoology**, v. 63, n. 4, p. 337–343, 1996;
- BOLÍVAR-RAMÍREZ, N. C. et al. Performance of pacific white shrimp fed probiotics *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* spp. in a biofloc system. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 47, p. e652, 2021;

- BONAMI, J. R. Shrimp Viruses. Em: **Encyclopedia of Virology: third edition**. 567–576. 3. ed. Academic Press, 2008. p. 3192;
- CASTRO, S. V. Proteínas de choque térmico HSP 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular - Heat shock protein Hsp70: structure and action in response to cellular stress. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.4, p.261-271, 2013;
- CASTEX, M. et al. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 4, p. 622–631, 2010;
- CHÍCHARO, M.; CHÍCHARO, L. RNA:DNA ratio and other nucleic acid derived indices in marine ecology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 8, p. 1453–1471, 2008;
- CORNÉLIO, F. H. G. et al. Crescimento, digestibilidade e resistência à infecção por patógeno em tilápia-do-nilo alimentada com probióticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 863–870, 2013;
- COSTA, R. F.; YASUMARU, F. A.; LEMOS, D. Nursery performance of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) postlarvae in different salinities. **Zoologia**, v. 27, n. 3, p. 317–323, 2010;
- COSTA REZENDE, P. et al. Brown seaweeds added in the diet improved the response to thermal shock and reduced *Vibrio* spp. in pacific white shrimp post-larvae reared in a biofloc system. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 6, p. 2852–2861, 2021;
- CUNHA, L.; GRENHA, A. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, p. 42, 2016;
- CRUZ-SÚAREZ, L. E. et al. A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture. **Avances en Nutrición Acuicola IX**. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuicola. Avances p, 303-333;
- DALZOCHIO, T. et al. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **International Aquatic Research**, v. 8, n. 4, p. 283–298, 2016;
- DANTAS, D. et al. Desempenho do *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado com uso de probiótico quando submetido à infecção por *Vibrio harveyi*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, n. 1, p. 85–90, 2009;
- DU, Y. et al. The influence of surface proteins on the probiotic effects of *Lactobacillus pentosus* HC-2 in the *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 92, p. 119–124, 2019;
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. **The state of world fisheries and aquaculture 2022: Towards blue transformation**. Rome. Disponível em: < <http://www.fao.org/documents/card/en/c/cc0461en> > Acesso em: 22 ago. 2022;
- FARIA, A. M. et al. Influence of starvation on the critical swimming behaviour of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its relationship with RNA/DNA ratios during ontogeny. **Scientia Marina**, v. 75, n. 1, p. 87–94, 2011;

- FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; COSTE, O.; MALTA, E. Polymer chitosan nanoparticles functionalized with *Ulva ohnoi* extracts boost in vitro Ulvan immunostimulant effect in *Solea senegalensis* macrophages. **Algal Research**, v. 26, p. 135–142, 2017;
- FOLEY, C. J.; BRADLEY, D. L.; HÖÖK, T. O. A review and assessment of the potential use of RNA:DNA ratios to assess the condition of entrained fish larvae. **Ecological Indicators**, v. 60, p. 346–357, 2016;
- FUMANAL, M. et al. Inclusion of dietary *Ulva ohnoi* 5% modulates *Solea senegalensis* immune response during *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 100, p. 186–197, 2020;
- GONG, H. et al. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* II. Active components of soybean lecithin. **Aquaculture**, v. 190, p. 325–342, 2000;
- GOROKHOVA, E. Effects of preservation and storage of microcrustaceans in RNA later on RNA and DNA degradation: Storage and preservation effects of RNAlater. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 3, n. 2, p. 143–148, 2005;
- GWAK, W.S. et al. Field evaluation by RNA/DNA ratios on post-release nutritional status of released and wild Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 293, n. 1, p. 107–124, 2003;
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 4, 2007;
- HINDU, S. V. et al. A review on the impact of seaweed polysaccharide on the growth of probiotic bacteria and its application in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 27, n. 1, p. 227–238, 2019;
- HOLT, C. C. et al. Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 107387, 2020;
- HÖÖK, T. O.; GOROKHOVA, E.; HANSSON, S. RNA:DNA ratios of Baltic Sea herring larvae and copepods in embayment and open sea habitats. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 76, n. 1, p. 29–35, 2008;
- HUFNAGL, M.; TEMMING, A. Are the RNA:DNA ratio and dry-weight-at-length suitable growth proxies for brown shrimps (*Crangon Crangon*)? **Scientia Marina**, v. 82, n. 1, p. 43, 20 2018;
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (ED.). **Pesquisas agropecuárias**. 3ª edição ed. Rio de Janeiro: IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018. 113 p. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101552.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2022.
- JEARAPHUNT, M. et al. Shrimp serine proteinase homologues PmMasSPH-1 and -2 Play a role in the activation of the prophenoloxidase system. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. 0121073, 2015;
- JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 213–236, 2006;

- JONES, B.; SMULLEN, R.; CARTON, A. G. Flavour enhancement of freshwater farmed barramundi (*Lates calcarifer*), through dietary enrichment with cultivated sea lettuce, *Ulva ohnoi*. **Aquaculture**, v. 454, p. 192–198, 2016;
- KAPLAN, L. A. E.; LEAMON, J.; CRIVELLO, J. F. The Development of a Rapid and Sensitive, High-Through-Put Protocol for RNA:DNA Ratio Analysis. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 13, p. 276-279, 2001;
- KAZIR, M. et al. Extraction of proteins from two marine macroalgae, *Ulva* sp. and *Gracilaria* sp., for food application, and evaluating digestibility, amino acid composition and antioxidant properties of the protein concentrates. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 194–203, 2019;
- KESARCODI-WATSON, A. et al. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, n. 1, p. 1–14, 2008;
- KIM, S. K. et al. Relationship between white spot symptom and physiological status of two Penaeid Shrimps. **Environmental Biology Research**, v. 35, n. 4, p. 461–467, 2017;
- KLONGKLAEW, N. et al. Antibacterial and antiviral activities of local thai green macroalgae crude extracts in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Marine Drugs**, v. 18, n. 3, p. 140, 2020;
- KUMAR, A.; SURESH BABU, P. P.; ROY, S. D. Assessment of immune response in post-probiotic treated *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio harveyi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 88, n. 2, p. 797–802, 2018;
- KUMAR, B. K. et al. Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. **Aquaculture**, v. 433, p. 247–251, 2014;
- KWON, K.-C. et al. An evaluation of microalgae as a recombinant protein oral delivery platform for fish using green fluorescent protein (GFP). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 87, p. 414–420, 2019;
- LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1765–1774, 2007;
- LAKSHMI, B.; VISWANATH, B.; SAI GOPAL, D. V. R. Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. **Journal of Pathogens**, v. 2013, p. 1–13, 2013;
- LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, p. 15, 2002;
- LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A.; ESTANTE, E. G. Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 1, p. 2–12, 2015;
- LEYVA-MADRIGAL, K. Y. et al. Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions. **Aquaculture**, v. 322–323, p. 16–22, 2011;

- LIMA, P. C. W. C. et al. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* em juvenis de *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 1, p. 79-85, 2009;
- LIU, Y. et al. Molecular characterization, immune responsive expression and functional analysis of QM, a putative tumor suppressor gene from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 37, 1-10, 2007;
- LORDAN, S.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. **Marine Drugs**, v. 9, n. 6, p. 1056–1100, 2011;
- MAIA, E. P. et al. Crescimento, sobrevivência e produção de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema intensivo. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 17, n. 1, 2012;
- MANGOTT, A. et al. *Ulva lactuca* as a functional ingredient and water bioremediator positively influences the hepatopancreas and water microbiota in the rearing of *Litopenaeus vannamei*. **Algal Research**, v. 51, p. 102040, 2020;
- MCGAW, I. J.; CURTIS, D. L. A review of gastric processing in decapod crustaceans, **Journal of Comparative Physiology B**, v 183, p. 443–465, 2013;
- MCGOVERN, MALACHY EDWARD. **Domestication of the green seaweed *Ulva ohnoi* aka ‘sea lettuce’ for Biofloc efluente bioremediation**. 2020. 84 f. Tese - University of Algarve – Portugal. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC;
- MD ZOQRATT, M. Z. H. et al. Microbiome analysis of Pacific white shrimp gut and rearing water from Malaysia and Vietnam: implications for aquaculture research and management. **PeerJ**, v. 6, p. e5826, 2018.
- MELGAR VALDES, C. E. et al. Efecto de microorganismos con potencial probiótico en la calidad del agua y el crecimiento de camarón *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) en cultivo intensivo. **Revista de Biología Tropical**, v. 61, n. 3, 2013;
- MELLO, H. et al. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 724–730, 2013;
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Análise de risco de importação: camarões não viáveis destinados ao consumo humano**. Brasília, DF: MAPA, 2019. 64 p. Disponível em: < https://www.gov.br/agricultura/pt-br/acao-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/documentos/ARlcamaroes_nao_viaveis.pdf >. Acesso em: 26 out. 2020;
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Coordenação de Animais Aquáticos – CAQ**. Brasília, DF: MAPA, 2021. 7 p. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2015/Decreto/D8539.htm>. Acesso em 09 fev. 2021;
- MOSER, JULIANA RIGHETTO. **Respostas bioquímicas do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran e determinação da prevalência natural do vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética Infeciosa - IHHNV**. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC;

MOSER, JULIANA RIGHETTO. **Biomarcadores moleculares no camarão branco, *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda), submetido a estresse ambiental e infectado pelo vírus da síndrome da mancha branca (White Spot Syndrome virus, WSSV)**. 2011. 93 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC;

MOSER, J. R.; VALENTIM-NETO, P. A. HSP70s: Discovery, Structure and Functions. Heat Shock Proteins HSP70: A Review on Shrimps - Chapter 2. **Nova Science Publishers**, v.1, p. 37-92, 2020;

MÜLLER, ISABEL CRISTINA. **Genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo *Litopenaeus vannamei* infectados pelo vírus da mancha branca e genotipagem de isolados geográficos brasileiros do vírus**. 2009. 146f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC;

NATORI, M. M. et al. Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações Econômicas** v. 41, n. 2, p. 62-73, 2011;

NEWAJ-FYZUL, A.; AUSTIN, B. Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. **Journal of Fish Diseases**, v. 38, n. 11, p. 937–955, 2015;

NUNES, A. J. P; FEIJÓ, R. G.; O vírus da mancha branca e a convivência no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Panorama da aquicultura**. 2016. Disponível em: <<https://panoramadaaquicultura.com.br/o-virus-da-mancha-branca-e-a-convivencia-no-cultivo-de-camarao-marinho-no-brasil/>>. Acesso em: 21 out. 2022.

OAKES, K. D.; VAN DER KRAAK, G. J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 447–463, 2003;

PAITAL, B. Removing small non-enzymatic molecules for biochemical assay of redox regulatory enzymes; An exemplary comments on “Antioxidant responses in gills and digestive gland of oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston) under lead exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 154, p. 337–340, 2018;

PANUTRAKUL, S.; SENANAN, W. Abundance of introduced Pacific whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) along the east coast of Thailand. **Aquatic Invasions**, v. 16, n. 4, p. 750–770, 2021;

PINOARGOTE, G. et al. Effects on survival and bacterial community composition of the aquaculture water and gastrointestinal tract of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to probiotic treatments after an induced infection of acute hepatopancreatic necrosis disease. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 10, p. 3270–3288, 2018;

SANTOS, R. N. et al. A brief history of *white spot syndrome virus* and its epidemiology in Brazil. **Sociedade Brasileira de Virologia** p. 8, 2013;

SANTOS-JUNIOR, M. M. et al. Suplementação dietética com probiótico e butirato de sódio no pré-berçário de *Litopenaeus vannamei*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 42, n. 3, p. 457–463, 2016;

- SCHLEDER, D. D. et al. Effect of brown seaweeds on Pacific white shrimp growth performance, gut morphology, digestive enzymes activity and resistance to white spot virus. **Aquaculture**, v. 495, p. 359–365, 2018;
- SCHLEDER, D. D. et al. Impact of combinations of brown seaweeds on shrimp gut microbiota and response to thermal shock and white spot disease. **Aquaculture**, v. 519, p. 734-779, 2020;
- SCHLEDER, D. D. et al. Thermal resistance of Pacific white shrimp fed *Sargassum filipendula*: A MALDI-TOF mass spectrometry approach. **Aquaculture**, v. 481, p. 103–111, 2017a;
- SERRANO, M. A.S. **Respostas enzimáticas e avaliação cito-genotóxica em ostras do pacífico *Crassostrea Gigas* (Thunberg 1793) expostas a fármacos**. 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC;
- SILVEIRA, A. S. et al. An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 79, p. 44–50, 2018;
- SIMIÃO, C. S. et al. Chemoprotection of amazonian *Mauritia flexuosa* fruit pulp against ammonia and nitrite toxicity to postlarvae shrimps *Litopenaeus vannamei*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 48. 2022;
- SOUZA, D. M. et al. Effect of temperature on antioxidant enzymatic activity in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in a BFT (Biofloc technology) system. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 47, n. 1, p. 1–10, 2014;
- SOUZA VALENTE, C. et al. Transcription of defense related genes in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, kept in biofloc and in clear seawater and challenged with the white spot syndrome virus. **Aquaculture International**, v. 28, n. 1, p. 293–307, 2020;
- SOUZA VALENTE, C. et al. White spot syndrome virus (WSSV) disturbs the intestinal microbiota of shrimp (*Penaeus vannamei*) reared in biofloc and clear seawater. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 18, p. 8007–8023, 2020a;
- SPELTA, ANA CAROLINA FERREIRA. **Caracterização e avaliação da qualidade da água de sistema intensivo de produção de camarão com bioflocos em diferentes salinidades**. 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG;
- STERZELECKI, F. C. et al. Minimum rotifer density for best growth, survival and nutritional status of Brazilian sardine larvae, *Sardinella brasiliensis*. **Aquaculture**, v. 534, p. 736264, 2021a;
- STERZELECKI, F. C. et al. Live diet for first feeding of Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis* (STEINDACHNER, 1879), larvae in captivity. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 11, p. 5558–5565, 2021b;
- TU, H. T. et al. Effects of pesticides and antibiotics on penaeid shrimp with special emphases on behavioral and biomarker responses. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 929–938, 2010^a;

- VALENTIM-NETO, PEDRO ALEXANDRE. **Caracterização do perfil diferencial de proteínas expressas em brânquias do camarão branco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) infectado versus não infectado com o vírus da mancha branca (WSSV)**. 2011. 148 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC;
- VALENTIM-NETO, P. A. et al. Hsp70 expression in shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to IHHNV and WSSV infection. **Virus Disease**, v. 25, n. 4, p. 437–440, 2014;
- VIEIRA, F. N. et al. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 6, p. 763–769, 2008;
- VIZCAÍNO, A. J. et al. Evaluation of *Ulva ohnoi* as functional dietary ingredient in juvenile *Senegalese sole* (*Solea senegalensis*): Effects on the structure and functionality of the intestinal mucosa. **Algal Research**, v. 42, p. 101608, 2019;
- WALKER, et al. Effects of temperature and starvation on ecophysiological performance of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 319, p. 439–445, 2011;
- WANG, A. et al. Use of probiotics in aquaculture of China - A review of the past decade. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 86, p. 734–755, 2019a;
- WANG, L. et al. Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, p. 1285–1291, 2012b;
- WYK, P. V.; SCARPA, J. Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. **Water Quality Requirements and Management**. p. 229, 1999;
- XIE, J. J. et al. Effects of dietary mixed probiotics on growth, non-specific immunity, intestinal morphology and microbiota of juvenile pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 90, p. 456–465, 2019.
- YE, T.; WU, X.; WU, W.; DAI, C.; YUAN, J. Ferritin protect shrimp *Litopenaeus vannamei* from WSSV infection by inhibiting virus replication. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 42, p. 138–143, 2015.
- ZACCHI, F. L. et al. Biochemical and molecular responses in oysters *Crassostrea brasiliensis* collected from estuarine aquaculture areas in Southern Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 135, p. 110–118, 2018.
- ZHENG, X. et al. Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* in different treatments on growth performance and immune gene expression of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal condition and stress of acute low salinity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 62, p. 195–201, 2017;
- ZHOU, Q. C. et al. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 364–365, p. 252–258, 2012;
- ZOKAEIFAR, H. et al. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 683–689, 2012.