



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

HUDSON DAMASCENO MAIA

**DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E EXPRESSÃO GÊNICA EM CAMARÕES *Penaeus*
vannamei ALIMENTADOS COM RAÇÕES SUPLEMENTADAS COM AS
MICROALGAS *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Conticribra weissflogii***

FORTALEZA

2024

HUDSON DAMASCENO MAIA

DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E EXPRESSÃO GÊNICA EM CAMARÕES *Penaeus vannamei* ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM AS MICROALGAS *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Conticribra weissflogii*

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Pesca.

Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof Dr Rodrigo Maggioni

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M186d Maia, Hudson Damasceno.
Desempenho zootécnico e expressão gênica em camarões *Penaeus vannamei* alimentados com ração suplementada com as microalgas *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Conticribra weissflogii* / Hudson Damasceno Maia. – 2024.
70 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.
1. Imunoestimulante. 2. Imunorregulação. 3. Carcinicultura. I. Título.

CDD 630

HUDSON DAMASCENO MAIA

DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E EXPRESSÃO GÊNICA EM CAMARÕES *Penaeus vannamei* ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM AS MICROALGAS *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Conticribra weissflogii*

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Aprovada em 19/07/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Rafael Santos Rocha

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. José William Alves da Silva

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Dr. Sergio Alberto Apolinario Almeida

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr Rodrigo Maggioni (orientador), pelos ensinamentos, pelo exemplo de dedicação e amor ao que se faz, por todo suporte e paciência durante o percurso do doutorado.

Ao Dr Rafael Santos Rocha por todo suporte nas práticas de genética e pela paciência e disposição em ensinar.

A Prof^a Dr^a Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante, pelo suporte e apoio durante o cultivo das microalgas e da preparação da ração utilizada no experimento.

Ao Prof Dr Alberto Jorge Pinto Nunes e a toda equipe do CEAC pela disponibilização das estruturas de cultivo e pela ajuda recebida no período do experimento, no qual fui chamado para assumir uma vaga na EMATERCE, e se não fosse esse suporte, eu não teria finalizado o experimento.

Aos professores Dr Sergio Alberto Apolinario Almeida e Dr José William Alves da Silva pela valiosa contribuição na banca de defesa da tese.

Ao Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias (*in memoriam*) pela primeira oportunidade de participar das atividades de um laboratório na graduação, pelo exemplo de pessoa ética, responsável e que amava e se dedicava sem medir esforços ao que fazia.

A minha namorada Daniela Andreska, pelo carinho, suporte e por suas valiosas contribuições para a minha tese.

Aos amigos Danilo Cavalcante, Daniel Borges, Eliak Lima e Jhonatas Viana pela ajuda prestada na realização do trabalho.

Aos amigos Vládila Oliveira, Lília Freitas, Daniel Borges, Lia Reck, Renato Teixeira, Sara Andrade, Alexandra Sampaio, Jhonatas Viana, Ingrid Siqueira, Juliana Freitas, Beatriz Emilly, Thalyanne Mendes e a todos os amigos da UFC que fizeram esse período da Pós-Graduação valer ainda mais a pena.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela bolsa auxílio disponibilizada durante parte do meu doutorado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação da Engenharia de Pesca da UFC pelos valiosos ensinamentos transmitidos.

Aos meus pais pelo suporte, paciência e incentivo.

RESUMO

É muito importante buscar formas de aumentar a resposta imunológica de camarões em cultivo para permitir o crescimento sustentável desta atividade econômica. O uso de compostos imunoestimulantes surge como uma alternativa para promover um maior estado de imunocompetência e bem-estar animal. O presente trabalho buscou avaliar o desempenho zootécnico e a expressão de genes imunológicos em camarões *Penaeus vannamei* alimentados com ração suplementada com 0,5% das microalgas *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Conticribra weissflogii*. Um total de 768 camarões de $0,43 \pm 0,02$ g (0,40 – 0,48 g) foram transferidos para 16 tanques de polietileno circulares com volume útil de 0,5 m³ com 48 camarões tanque⁻¹. Os animais foram alimentados durante 43 dias com as dietas experimentais. Ao fim do período experimental, os animais foram coletados, contados e pesados para calcular a sobrevivência e performance de crescimento (peso corporal final, sobrevivência, consumo aparente de ração, produtividade final e fator de conversão alimentar) nos respectivos tratamentos. Cinco animais de cada tanque foram amostrados após cinco dias de cultivo e ao fim do experimento para as análises de expressão gênica a partir do hepatopâncreas. A suplementação das dietas experimentais com as microalgas *A. platensis*, *C. vulgaris* e *C. weissflogii* apresentou um notável impacto positivo sobre a taxa de sobrevivência, a produtividade final e o fator de conversão alimentar. Contudo, não foi verificado uma melhora significativa nos parâmetros peso corporal final e consumo de ração aparente. O estímulo da suplementação somente afetou significativamente a expressão de dois genes, TGF e TNF, os quais foram expressos em altos níveis somente nos camarões alimentados com a *A. platensis* após 43 dias de cultivo, o que melhorou o estado de imunocompetência dos animais. Novos estudos são necessários para oferecer novas perspectivas sobre a investigação dos processos moleculares que regulam o sistema imunológico e as reações metabólicas nos camarões.

Palavras-chave: imunoestimulante; imunorregulação; carcinicultura.

ABSTRACT

It is very important to seek ways to increase the immunological response of shrimp in culture to allow the sustainable growth of this economic activity. The use of immunostimulating compounds appears as an alternative to promote a greater state of immunocompetence and animal well-being. The present work sought to evaluate the growth performance and immune-related genes expression in *Penaeus vannamei* shrimp fed with feed supplemented with 0.5% of the microalgae *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Conticribra weissflogii*. A total of 768 shrimp weighing 0.43 ± 0.02 g (0.40 – 0.48 g) were transferred to 16 circular polyethylene tanks with a useful volume of 0.5 m³ under 48 shrimp tank⁻¹. The animals were fed experimental diets for 43 days. At the end of the experimental period, the animals were collected, counted and weighed to calculate survival and growth performance (final body weight, apparent feed consumption, final productivity and feed conversion ratio) in the respective treatments. Five animals from each tank were sampled after five days of cultivation and at the end of the experiment for gene expression analyzes from the hepatopancreas. Supplementing the experimental diets with the microalgae *A. platensis*, *C. vulgaris* and *C. weissflogii* had a notable positive impact on the survival rate, final productivity and feed conversion ratio. However, there was no significant improvement in the parameters final body weight and apparent feed intake. The supplementation stimulus only significantly affected the expression of two genes, TGF and TNF, which were expressed at high levels only in shrimp fed with *A. platensis* after 42 days of cultivation, microalgae, which improved the immunocompetence status of the animals. New studies are needed to offer new perspectives on investigating the molecular processes that drives the immune system and metabolic reactions in shrimp.

Keywords: immunostimulant; immunoregulation; shrimp farming.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Microscopia óptica da <i>A. platensis</i> do cepáreo do Laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC.....	22
Figura 2 –	Ultraestrutura esquemática da <i>Chlorella vulgaris</i> representando diferentes organelas.....	26
Figura 3 –	Microscopia óptica da <i>Conticribra weissflogii</i> do cepáreo do Laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC.....	28
Figura 4 –	Sistema de produção da microalga <i>Arthrospira platensis</i> no CEBIAQUA, no Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.....	30
Figura 5 –	Cultivo das microalgas <i>C. weissflogii</i> e <i>C. vulgaris</i> em meio de cultivo GUILLARD f/2.....	33
Figura 6 –	Floculação química (NaOH, 2 N) da <i>C. vulgaris</i> para obtenção da biomassa algal.....	33
Figura 7 –	Tanques de cultivo experimental dos camarões.....	36
Figura 8 –	Representação da distribuição dos tanques na fase de cultivo dos camarões.....	37
Figura 9 –	Mapa de calor da expressão relativa de 7 genes do hepatopâncreas de camarões após 5 e 42 dias de alimentação com as diferentes dietas experimentais.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Variações diárias de salinidade (g L^{-1}), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e pH ao longo do período de cultivo (42 dias). Cada valor representa a média de 16 leituras diárias (13:30h).....	42
Gráfico 2 –	Produtividade final dos camarões alimentados com as diferentes dietas experimentais.....	44
Gráfico 3 –	Fator de conversão alimentar dos camarões alimentados com as diferentes dietas experimentais.....	45
Gráfico 4 –	Sobrevivência dos camarões alimentados com as diferentes dietas experimentais.....	46
Gráfico 5 –	Painel de expressão relativa de 7 genes do hepatopâncreas de camarões após 5 e 42 dias de alimentação com as diferentes dietas experimentais.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição do meio padrão Guillard f/2.....	32
Tabela 2 –	Composição da solução de metais traço do meio Guillard f/2.....	32
Tabela 3 –	Composição (%) dos constituintes da ração utilizadas para alimentar os camarões.....	34
Tabela 4 –	Lista de primers utilizados na análise de expressão gênica.....	40
Tabela 5 –	Desempenho zootécnico de camarões <i>L. vannamei</i> cultivados em tanques em ambiente externo durante 43 dias.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	HIPÓTESE.....	14
3	OBJETIVO.....	15
3.1	Objetivo geral.....	15
3.2	Objetivos específicos.....	15
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
4.1	Sistema imune dos crustáceos.....	16
4.2	Imunoestimulantes com ênfase nos Polissacarídeos sulfatados (PS) e Lipopolissacarídeos (LPS).....	19
4.3	Microalgas na aquicultura.....	20
4.3.1	<i>Arthrospira platensis</i>.....	22
4.3.2	<i>Chlorella vulgaris</i>.....	25
4.3.3	<i>Conticribra weissflogii</i>.....	27
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1	Cultivo das microalgas <i>Arthrospira platensis</i>, <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Conticribra weissflogii</i>.....	30
5.1.1	<i>Cultivo da microalga Arthrospira platensis</i>.....	30
5.1.2	<i>Cultivo das microalgas Chlorella vulgaris e Conticribra weissflogii</i>.....	32
5.2	Preparação das dietas.....	34
5.3	Local de cultivo dos camarões.....	35
5.4	Unidades experimentais e qualidade de água.....	35
5.5	Pós-larvas e povoamento dos tanques.....	36
5.6	Manejo alimentar e qualidade de água.....	37
5.7	Parâmetros zootécnicos.....	38
5.8	Coleta das amostras.....	39
5.9	Extração do RNA e síntese de cDNA.....	39
5.10	Expressão relativa dos genes imunológicos.....	39
5.11	Análise estatística.....	41

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6.1	Qualidade de água.....	42
6.2	Desempenho zootécnico dos camarões.....	43
6.3	Expressão relativa dos genes imunológicos.....	48
7	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Com a produção de pescado oriundo da atividade pesqueira praticamente estagnada desde o fim da década de 1980, a aquicultura tem sido responsável pelo aumento da oferta de pescado para o consumo humano (FAO, 2024). A produção aquícola mundial de animais aquáticos cultivados cresceu em média 6,7% ao ano no período de 1990 a 2020, chegando a representar, nesse último ano, 49% da produção mundial total de pescado, com uma produção de cerca de 122,6 milhões de toneladas, com um valor total de USD 281,5 bilhões (FAO, 2022). Em 2020, a produção de animais aquáticos consistiu em 57,5 milhões de toneladas de peixes (USD 146,1 bilhões), 17,7 milhões de toneladas de moluscos (USD 29,8 bilhões), na sua maioria bivalves, 11,2 milhões de toneladas de crustáceos (USD 81,5 bilhões), 525 mil toneladas de invertebrados aquáticas (USD 2,5 bilhões), 700 toneladas de pérolas e conchas ornamentais (USD 179 mil) e 537 mil toneladas de espécies semi-aquáticas como tartarugas e rãs (USD 5 bilhões) (FAO, 2022).

Dentre as 49 espécies de crustáceos registradas na estatística da FAO, o camarão branco do Pacífico, *Penaeus vannamei*, se destaca como a espécie mais cultivada no mundo, representando 51,7% da produção total de crustáceos cultivados, com uma produção de 5812,2 mil toneladas em 2020 (FAO, 2022.).

Em 2022 o Brasil atingiu uma produção aquícola aproximada de 730,6 mil toneladas de pescado cultivado, sendo a maior parte oriunda da criação de peixes (84,5%, 617,3 mil toneladas), seguida pela criação de camarões (15,5%, 113,3 mil toneladas). A região Nordeste responde pela quase totalidade da produção de camarões do país (99,6%), com destaque para a produção do Ceará (54,1%) e do Rio Grande do Norte (22,2%) (IBGE, 2023).

O *P. vannamei* desponta na preferência dos produtores por apresentar excelentes características zootécnicas como boa sobrevivência em cultivo, facilidade na adaptação ao ambiente, boa conversão alimentar, crescimento rápido, rusticidade no manejo e facilidade de reprodução em cativeiro (Bezerra, Silva, Mendes, 2007), além de poder ser cultivado em uma ampla faixa de salinidade (Nunes, 2001; Gunalan *et al.*, 2013).

No entanto, o desenvolvimento da aquicultura enfrenta muitos desafios, dentre os quais incluem-se custo de produção (ração, energia etc.), poluição e falta de qualidade de água (SHARAWY *et al.*, 2022). Desse modo, condições ambientais impróprias ou adversas, rações de baixa qualidade, manejo inadequado dos animais, altas densidades de produção nos cultivos de camarões reduzem a qualidade ecológica do ambiente e fisiológica dos animais e,

dessa forma, propiciam o surgimento, a transmissão horizontal e vertical de patógenos, especialmente de origem viral e bacteriana, os quais causam grande mortalidade e, conseqüentemente, grandes prejuízos econômicos (Bachère, 2000; Borghetti, N; Ostrensky; Borghetti, J, 2003; Flegel; Lightner; Owens, 2008; Barracco; Perazzolo; Rosa, 2014; Emerenciano *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022).

Estima-se que 60% da mortalidade de camarões seja atribuída a doenças virais, 20% a infecções bacterianas e o restante a doenças fúngicas e parasitárias (Flegel, 2012; Lee *et al.*, 2022). Desse modo, visando à sustentabilidade da atividade e a redução dos prejuízos, faz-se necessário a adoção de medidas de biossegurança, boas práticas de manejo e formas de aumentar a imunocompetência dos camarões, através do uso de substâncias imunoestimulantes naturais que minimizem o uso de químicos, como os antibióticos (Bachère; Miahle; Rodrigues, 1995; Thitamadee *et al.*, 2016; Anirudhan *et al.*, 2021).

Assim, o desenvolvimento de dietas otimizadas para os camarões poderá melhorar a saúde dos animais, o crescimento e a eficiência da produção dos camarões cultivados, além de reduzir os desperdícios na alimentação (alimento não consumido e fezes) (Andersen *et al.*, 2005; Sharawy *et al.*, 2022).

Os invertebrados marinhos não apresentam o sistema imunológico adaptativo, não podendo produzir anticorpos antígeno-específicos nem memória imunológica. Portanto, devido à impossibilidade de vacinação dos camarões, tem-se recorrido ao uso de substâncias imunoestimulantes com o objetivo de lhes promover um estado de maior imunocompetência para que numa eventual infecção, os animais apresentem uma resposta imunológica mais rápida e eficaz contra os patógenos (Barracco; Perazzolo; Rosa, 2008).

Os compostos imunoestimulantes normalmente são oriundos de fontes naturais, podendo ser obtidos, também, por meio de síntese química. Na sua maioria, estes compostos são componentes da parede celular de bactérias, fungos e algas. Dentre os compostos ditos imunoestimulantes mais ofertados aos camarões, destacam-se os polissacarídeos sulfatados (PS), os peptidoglicanos, os lipopolissacarídeos (LPS) e algumas proteínas virais (Smith; Brown; Hauton, 2003).

A administração de imunoestimulantes pode aumentar a sobrevivência, bem como melhorar o crescimento de peixes e camarões (Talpur; Ikhwanuddin; Ambokbolong, 2015). Além de apresentarem um mínimo de efeitos colaterais e um melhor custo benefício em relação aos produtos comerciais (Yeganeh; Teimouri; Amirkolaie, 2015).

Os compostos imunoestimulantes podem ser ofertados de diferentes maneiras aos camarões: imersão, injeção ou como complemento alimentar adicionado a ração. Este último

apresenta uma maior facilidade na administração e promove um menor estresse ao animal (Smith; Brown; Hauton, 2003).

Particularmente, estudos recentes têm sugerido o uso de células e/ou extratos algais como aditivos alimentares nas dietas e como substitutos para o uso de antibióticos na aquicultura (Ashour *et al.*, 2020; Mansour *et al.*, 2021; Sharawy *et al.*, 2022).

A efetividade da suplementação na dieta para peixes e camarões vai depender do nível de implementação, da forma, duração e regime de alimentação dos animais. Dessa forma, alimentar os animais com formas adequadas de imunoestimulantes e em doses apropriadas poderia aumentar o desempenho zootécnico, a utilização da ração e estimular o sistema imunológico dos animais aquáticos cultivados, tornando-os mais resistentes a infecções (Arayamethakorn *et al.*, 2023; Ashour *et al.*, 2021; Pilotto *et al.*, 2019).

A efetividade do uso de imunoestimulantes de diferentes origens naturais tem sido amplamente estudada em camarões cultivados no que se refere a desempenho zootécnico e sanitário (Pilotto *et al.*, 2019; Sharawy *et al.*, 2022). Entretanto, os mecanismos moleculares relativos às propriedades benéficas dos imunoestimulantes como também os efeitos modulatórios sobre a expressão gênica são pouco conhecidos.

2 HIPÓTESE

A alimentação dos camarões com dietas suplementadas com as microalgas poderá melhorar o desempenho zootécnico dos animais cultivados e modular a expressão de genes relacionados aos processos digestivos e imunológicos.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação da ração com a cianobactéria *Arthrospira platensis*, com a clorofícea *Chlorella vulgaris*, e com a diatomácea *Conticribra weissflogii*, sobre o desempenho zootécnico e a expressão de genes imunológicos no camarão marinho *Penaeus vannamei*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o desempenho zootécnico dos animais alimentados com as rações suplementadas com a cianobactéria *Arthrospira platensis*, com a clorofícea *Chlorella vulgaris*, e com a diatomácea *Conticribra weissflogii*;
- b) Avaliar a expressão de genes imunológicos (TNF, LYZ, TGF- β , Dicer, proPO, Crustina e peneidina-3a) no hepatopâncreas no quinto dia de cultivo e ao fim do período de cultivo (43 dias).

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Sistema imune dos crustáceos

Os camarões possuem uma relevância especial dentro do grupo dos crustáceos, dada a sua importância econômica na aquicultura mundial. Entretanto, o êxito desta atividade vem sofrendo graves limitações, devido ao surgimento de novas enfermidades, principalmente as de origem bacteriana e viral, que provocam mortalidade massiva e geram prejuízos de ordem econômica incalculáveis (Barracco; Perazzolo; Rosa, 2014; Trang *et al.*, 2019).

Em crustáceos, as respostas imunológicas no âmbito celular envolvem os hemócitos, que são as células imunocompetentes, e as reações humorais, que são desencadeadas por moléculas dissolvidas na hemolinfa. Ambas as respostas atuam em sinergismos para garantir a proteção do organismo contra agentes invasores (Cantelli, 2009). As moléculas efetoras do sistema imune dos crustáceos (proteínas e peptídeos) são encontradas principalmente nos hemócitos e na hemolinfa, que são os principais locais onde as reações imunes acontecem, enquanto algumas são encontradas em certos órgãos ou tecidos, como as brânquias, intestino e órgão linfóide, por exemplo (Gross *et al.*, 2001; Tassanakajon *et al.*, 2013).

Os principais sistemas de defesa reconhecidos nos crustáceos são a coagulação da hemolinfa, a melanização, o reconhecimento e aglutinação celular, os sistemas antibacterianos, antifúngicos e antivirais, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROIs, do termo em inglês, *Reactive Oxygen Intermediates*) e nitrogênio (RNIs, do termo em inglês, *Reactive Nitrogen Intermediates*) e os sistemas fagocítico e de encapsulamento (Iwanaga; Lee, 2005).

O reconhecimento dos patógenos pelo organismo dos crustáceos é feito mediante suas proteínas/receptores de reconhecimento-padrão ou P/RRPs que são responsáveis por diferenciar o próprio do não-próprio, reconhecendo os padrões moleculares específicos dos microrganismos ou M/PAMPs (*microbial/pathogen-associated molecular patterns*) (Janeway; Medzhitov, 2002).

As PRPs são moléculas produzidas pelo hospedeiro e secretadas no plasma ou localizadas na superfície ou interior dos hemócitos que reconhecem e ligam-se os seus PAMPs respectivos. Os principais PAMPs reconhecidos pelas PRPs em crustáceos são os lipopolissacarídeos (LPS) da parede de bactérias Gram-negativas, as peptidoglicanas (PGs) da

parede celular das Gram-positivas, as β -1,3-glicanas da parede de fungos e o dsRNA (doublestranded RNA) produzido durante a replicação de vários vírus (Wang; Wang, 2013).

Qualquer que seja o tamanho dos PAMPs que penetrem no organismo dos crustáceos, eles serão reconhecidos e ligados às suas PRPs específicas, acionando assim o gatilho para a ativação do sistema imune inato do animal que é iniciado pela degranulação dos hemócitos, desencadeando uma resposta imune-celular com a produção e liberação de uma série de moléculas imunofetoras acompanhadas, ainda, pelo aumento da expressão de genes imunológicos específicos (Barracco, Perazzolo; Rosa, 2014).

Dentre as reações celulares de defesa, a primeira a ser ativada é a fagocitose. A destruição e neutralização dos microrganismos invasores fagocitados pelos hemócitos se deve à produção e liberação de moléculas altamente tóxicas, como as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. No momento do contato e reconhecimento do patógeno, a enzima NADPH-oxidase é ativada, ocorrendo assim um aumento significativo no consumo de oxigênio intracelular (ou burst respiratório) que resulta na produção de radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Bogdan; Rollingshoff; Diefenbach, 2000; Muñoz *et al.*, 2002). Estes radicais livres são espécies reativas para o hospedeiro e, como mecanismo de proteção, o animal produz concomitantemente várias enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutationa-peroxidase para neutralizar esses compostos (Barracco, Perazzolo; Rosa, 2014).

Os crustáceos possuem estocados nos grânulos de seus hemócitos, peptídeos antimicrobianos ou PAMs que funcionam como antibióticos naturais pois apresentam uma ação rápida e potente contra um amplo espectro de microrganismos, tais como bactérias, fungos filamentosos, leveduras e, em alguns casos, vírus e protozoários. Os PAMs são considerados de grande importância para o controle e prevenção de infecções nos crustáceos (BACHÈRE *et al.*, 2004; Reddy; Yedery; Aranha, 2004; Barracco; Perazzolo; Rosa, 2008).

Estas proteínas e peptídeos geralmente apresentam uma ação detergente ou formadora de grandes poros, que levam ao desequilíbrio das funções da membrana, ou podem ainda entrar nas células, interferindo nas diferentes vias metabólicas essenciais ao ciclo de vida dos microrganismos (Bulet; Stöcklin; Menin, 2004; Toke, 2005). O mecanismo de ação dos PAMs é, portanto, provocar a desestabilização da membrana celular dos microrganismos invasores e, conseqüentemente, sua morte. Como os PAMs agem diretamente sobre a membrana das células, estrutura necessária para a sobrevivência dos microrganismos, os

mecanismos de resistência para essas moléculas são praticamente inviáveis (Barracco; Perazzolo, Rosa, 2008).

Outra resposta imunológica dos crustáceos que se mostra bastante eficiente contra a invasão de microrganismos é o sistema de ativação da pró-fenoloxidase ou sistema proPO. Este eficiente sistema de defesa consiste de uma variedade de proteínas que são produzidas em uma cascata proteolítica e são responsáveis por reações citotóxicas que ativam a fagocitose e resultam na formação de nódulos e cápsulas, apresentando como resultado final a melanização (Jiravanichpaisal; Lee; Soderhall, 2006). O sistema proPO é ativado pelos PAMPs dos patógenos, tais como LPS e β -1,3 glicanas, que invadem o organismo do hospedeiro.

O sistema proPO é composto por várias PRPs, muitas serino-proteases e seus zimógenos incluindo a pró-fenoloxidase e durante a ativação da cascata, vários compostos intermediários, como os ROIs, RNIs e as quinonas, são produzidos e liberados para a hemolinfa. Os compostos intermediários que são produzidos durante esse processo são as substâncias citotóxicas tanto para os microrganismos invasores, como para o hospedeiro e por este motivo, os animais contam com inibidores de proteases para garantir a ativação do sistema proPO apenas no local de injúria/infecção (Abele; Puntarulo, 2004). A etapa final do processo é a melanização, sendo que o pigmento melanina não tem função imunoefetora, possuindo, contudo, ação fungistática e sequestradora de radicais livres produzidos no processo (Nappi; Ottaviani, 2000).

Os inibidores de proteases dos invertebrados que regulam a ativação do sistema proPO estão presentes tanto no plasma como nos hemócitos. Nos crustáceos o principal inibidor de protease é a pacifastina (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).

Outro inibidor de proteases que participa da regulação do sistema proPO dos peneídeos é a glicoproteína plasmática denominada α 2-macroglobulina (α 2M) que é constitutivamente sintetizada pelos hemócitos (Gross *et al.*, 2001; Rattanachai *et al.*, 2004) e estocada nos grânulos dos hemócitos (Perazzolo *et al.*, 2011). Este inibidor apresenta um grande espectro de atuação inibindo tanto proteases exógenas produzidas pelos patógenos durante o processo infeccioso, como proteases endógenas produzidas pelo hospedeiro (Armstrong, 2006).

Doenças em camarões, principalmente as virais, apresentam efeitos negativos na economia em um grande grupo de países produtores deste organismo na Ásia e nas Américas do Sul e Norte. Estudos sobre a imunidade de camarões e outros crustáceos abrangem os aspectos gerais e consequências no sistema imune, buscando conhecer os mecanismos de resposta a doenças nestes animais (Liu; Söderhäll; Jiravanichpaisal, 2009; Pilotto *et al.*,

2019). A manutenção de um bom estado nutricional dos animais também apresenta relevância sobre os parâmetros imunológicos, uma vez que s e faz necessário a presença de proteínas para a geração de moléculas que irão combater os agentes infecciosos (Martín *et al.*, 2012).

4.2 Imunoestimulantes com ênfase nos Polissacarídeos sulfatados (PS) e Lipopolissacarídeos (LPS)

Os compostos imunoestimulantes normalmente são oriundos de fontes naturais, podendo ser obtidos, também, por meio de síntese química. Na sua maioria, estes compostos são componentes da parede celular de bactérias, fungos e algas. Dentre os compostos ditos imunoestimulantes mais ofertados aos camarões, destacam-se os polissacarídeos sulfatados (PS), os peptidoglicanos, os lipopolissacarídeos (LPS) e algumas proteínas virais (Smith; Brown; Hauton, 2003).

Os LPS estão presentes na parede celular de bactérias Gram-negativas e das cianobactérias e são reconhecidos, no caso das bactérias, como um componente endotóxico e antigênico (Keleti *et al.*, 1982).

Estudos com PS de macroalgas têm mostrado que suas estruturas variam de espécie para espécie e, às vezes, em diferentes partes da planta (Dietrich *et al.*, 1995). A complexidade na estrutura desses compostos se deve às muitas possibilidades de ligações entre os monossacarídeos e à distribuição de grupos sulfato (Alves, 2000). Sendo assim, cada PS pode possuir conformação estrutural única e, portanto, apresentar atividades biológicas diferentes ou mais potentes do que outros polissacarídeos, ou outros compostos já descritos. Além disso, diferentes métodos de extração podem, também, resultar em atividades biológicas distintas para um mesmo composto. Deste modo, a identificação de um novo PS ou o desenvolvimento de um novo método de extração vem sempre acompanhado de perspectivas para descoberta de um novo fármaco (Rocha *et al.*, 2004).

A administração de imunoestimulantes pode aumentar a sobrevivência, bem como melhorar o crescimento de peixes e camarões (Talpur; Ikhwanuddin; Ambokbolong, 2015). Além de apresentarem um mínimo de efeitos colaterais e um melhor custo benefício em relação aos produtos comerciais (Yeganeh; Teimouri; Amirkolaie, 2015). Vargas-Albores (2002) relatou que a avaliação da eficiência de um imunoestimulante depende de suas características farmacológicas, das condições fisiológicas do animal e das condições ambientais. Em camarões, por exemplo, existe a possibilidade de os animais não responderem

ao tratamento com imunostimulante devido à má nutrição ou ao comprometimento fisiológico com outros processos como, muda e reprodução.

Os compostos imunostimulantes podem ser ofertados de diferentes maneiras aos camarões: imersão, injeção ou como complemento alimentar adicionado a ração. Este último apresenta uma maior facilidade na administração e promove um menor estresse ao animal (Smith; Brown; Hauton, *op. cit.*).

A imersão de juvenis de camarão *Litopenaeus vannamei* em solução de β -glucanas e de PS extraídos da cianofíceia *Cyanothece sp.* resultou em respostas semelhantes, ativando o sistema imune através de um aumento da produção de ânion superóxido. Embora esta ativação tenha sido muito similar para os dois açúcares, os PS foram utilizados em uma dosagem 500 vezes menor do que o outro componente testado (Campa-Córdova *et al.*, 2002).

Em outro estudo, os PS extraídos da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* foram adicionados na ração de tilápias, *Oreochromis niloticus*, submetidas à reversão sexual, sendo observado um melhor crescimento dos indivíduos que receberam determinada dose (Farias *et al.*, 2004), já os PS obtidos da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* foram introduzidos na alimentação de pós-larvas de peixes em doses de 0,1 e 0,2 mg g⁻¹ o que resultou em uma melhor resistência das pós-larvas a condições estressantes, como falta de oxigênio e má qualidade da água (Araújo, 2006).

4.3 Microalgas na aquicultura

As microalgas são uma coleção diversa de micro-organismos que produzem oxigênio por meio da fotossíntese. Elas não pertencem a um único grupo monofilético, o que dificulta a sua definição (Richmond; Hu, 2013).

Estes micro-organismos fotossintetizantes podem crescer rapidamente utilizando-se da energia solar e de compostos inorgânicos como dióxido de carbono, nitrogênio e fósforo (Grima *et al.*, 2003). As microalgas normalmente apresentam uma eficiência na conversão da energia solar em bioenergia cerca de dez vezes superior a das plantas terrestres por unidade de área (Amaro; Macedo; Malcata, 2012; Halim; Danquah; Webley, 2012), devido ao crescimento ocorrer em meio aquoso (Zhao; Ma; Liu, 2018).

As microalgas são micro-organismos que apresentam clorofilas, além de outros pigmentos, e formam a base da cadeia trófica. Elas apresentam diversas aplicações, por exemplo, na alimentação humana e animal, composição de fármacos e cosméticos, tratamento de águas residuais, produção de biocombustíveis (Lee; Han, 2015). Ademais, as microalgas

não precisam competir com as culturas agrícolas para produção de alimentos, pois podem ser cultivadas em terras não aráveis (Mohan *et al.*, 2015), e ainda apresentam rápido crescimento e elevado rendimento por unidade de área (Zeng *et al.*, 2015).

As microalgas podem ser cultivadas utilizando-se nutrientes presentes em águas residuárias (Chiu *et al.*, 2015), inclusive efluente da aquicultura, reduzindo, dessa forma, a carga de nitrogênio e fósforo e proporcionando o tratamento biológico do efluente (Markou; Georgakakis, 2011).

Em larviculturas de peixes e camarões, as microalgas são uma importante fonte de alimento vivo que fornecem todo o requerimento nutricional para as larvas aquáticas, como também para as espécies de zooplâncton cultivadas (Magouz *et al.*, 2021; Zaki *et al.*, 2021; Sharawy *et al.*, 2022). Além disso, as microalgas desempenham um papel importante na purificação da água do cultivo, estabilizando e mantendo o equilíbrio do ecossistema do tanque de cultivo (Silveira *et al.*, 2020; Zhang, P. *et al.*, 2022).

A seleção da espécie de microalga a ser cultivada deve levar em consideração o crescimento rápido nas condições de cultivo em que a microalga será produzida (sem perda das suas características nutricionais), ser facilmente separada da água por filtração, além de tolerar alterações nos parâmetros físico-químicos como salinidade e temperatura e possuir valor comercial (Silva, 2013).

Uma variedade de microalgas procariotas (cianobactérias) e eucariotas tem sido identificadas como candidatas promissoras para a produção de materiais úteis, como compostos químicos e biocombustíveis, alguns dos quais são comercialmente viáveis (MAEDA *et al.*, 2018). Não é apenas a presença de um determinado composto em particular que torna esses micro-organismos interessantes, mas também sua enorme diversidade e a possibilidade de não apenas produzi-los, mas também de cultivá-los em diferentes condições, levando a um aumento na produção de alguns compostos bioativos (Plaza *et al.*, 2010).

As microalgas podem se adaptar rapidamente às mudanças nas condições de cultivo quanto à variação de salinidade, temperatura, nutrientes e irradiação (Mobin; Alam, 2017), variando suas características químicas de acordo com fatores como as condições e tempo de cultivo, método de extração, mesmo que a aparência delas seja similar (Wan; Wu; Kuča, 2016).

A escolha do sistema de cultivo precisa ser elaborada para cada cepa de microalga considerando algumas características básicas como iluminação, circulação e trocas gasosas (suprimento de gás carbônico, eliminação de oxigênio) (Masojídek; Torzillo, 2014). Basicamente, são empregadas duas formas de produção de biomassa de microalgas em massa:

(1) Tanques abertos ao ar livre, que são reservatórios abertos e apresentam uma área de cultivo relativamente grande e (2) Fotobiorreatores, onde o cultivo acontece em recipientes fechados ou semifechados, com luz natural ou artificial (Masojídek; Torzillo, 2014; Shin *et al.*, 2018).

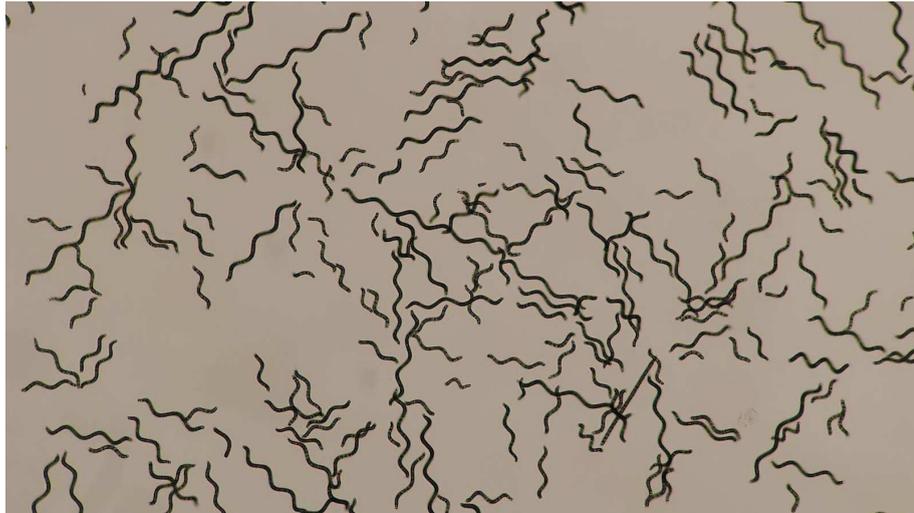
Os fotobiorreatores apresentam um menor risco de contaminação, maior facilidade de manutenção das condições do cultivo, redução da perda de água por evaporação e facilidade de suprir a demanda de CO₂ em relação aos tanques abertos (Liao *et al.*, 2014). Além do mais, apenas um número limitado de espécies de microalgas é adequado para ser cultivado em tanques abertos ao ar livre por tolerarem um ambiente de cultivo severo. Os exemplos clássicos são: *Dunaliella* em salinidade elevada, *Arthrospira* em alcalinidade elevada e *Chlorella* em concentração de nutrientes elevada (Harun *et al.*, 2010).

Os sistemas de produção ao ar livre podem ser limitados por uma série de parâmetros, como, por exemplo, intensidade luminosa, pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, predação, os quais contribuem significativamente para o sucesso do cultivo e devem ser monitorados continuamente. Contudo, esses sistemas de produção apresentam um menor custo de implantação e de operação, sendo mais duráveis e apresentando uma maior capacidade de produção quando comparado com fotobiorreatores mais sofisticados (Masojídek; Torzillo, 2014).

4.3.1 *Arthrospira platensis*

A microalga *Arthrospira platensis* é um organismo fotossintético, filamentoso, com formato espiralado, multicelular, com coloração verde-azulada. Como este micro-organismo contém clorofila *a*, do mesmo modo que os vegetais superiores, os botânicos o classificam como microalga pertencente à Classe Cyanophyceae. Mas, de acordo com os bacteriologistas, ele é classificado como bactéria (cianobactéria), devido a sua estrutura procariótica (Koru, 2012) (Figura 1).

Figura 1 - Microscopia óptica da *A. platensis* do cepáreo do Laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC.



Fonte: Autor.

A classificação taxonômica dessa microalga tem sido bastante estudada e ainda há indefinições apesar dos contínuos avanços resultantes das análises moleculares. Divergências à parte, de acordo com o Algae Base (2023), o gênero *Arthrospira* tem 24 espécies taxonomicamente aceitas. A classificação taxonômica da microalga *A. platensis* Gomont está apresentada abaixo.

Filo Cyanobacteria

Classe Cyanophyceae

Ordem Oscillatoriales

Família Microcoleaceae

Gênero *Arthrospira*

Espécie *A. platensis*

Segundo a FAO (2024), os valores de produção global da *Arthrospira*, normalmente comercializada como Spirulina, cultivada nos anos de 2005, 2010, 2013 e 2014 foram da ordem de 48 mil, 97 mil, 82 mil e 86 mil toneladas, respectivamente. A própria FAO reconhece que a produção de microalgas corresponde a uma pequena parcela da aquicultura mundial e admite que os dados contabilizam apenas uma fração da produção real no mundo e, portanto, estão significativamente subestimados. Na verdade, as Spirulinas e outras microalgas são produzidas em larga escala há muitos anos em países como Austrália, Índia, Israel, Japão, Malásia e Mianmar, sem que os dados de produção sejam reportados a FAO.

A. platensis é rica em proteínas e aminoácidos essenciais, vitaminas C e E e provitamina “A”, minerais como ferro, cálcio, cromo, cobre, magnésio, manganês, fósforo,

potássio, sódio e zinco, ácidos graxos essenciais como ácido gama-linolênico e pigmentos como clorofila *a*, ficocianina e carotenoides (Soni; Sudhakar; Rana, 2017).

A parede celular é composta pelo peptidoglicano, por vezes denominado mureína, que consiste em um heteropolissacarídeo ligado a peptídeos presentes na parede celular de procariontes que, diferentemente da celulose, é facilmente digerido pelas enzimas digestivas dos animais e, após um período de 18 h, mais de 85% do conteúdo proteico da *A. platensis* pode ser digerido e assimilado (Wan; Wu; Kuča, 2016).

Na parede celular de *A. platensis* também são encontrados lipopolissacarídeos e, no citoplasma, há presença de polissacarídeos sulfatados com ação imunomoduladora já demonstrada em mamíferos, peixes e crustáceos (Chen *et al.*, 2014; Hirahashi *et al.*, 2002; Pilotto *et al.*, 2019; Watanuki *et al.*, 2006), somando-se ao aumento da imunidade inata e da resistência contra infecções causadas pela bactéria *Vibrio alginolyticus* em camarão *Penaeus vannamei* (Tayag *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2016).

Geralmente, *A. platensis* apresenta de 55% a 70% de proteína, de 15% a 25% de polissacarídeos, de 6% a 13% de ácidos nucleicos, de 5% a 6% de lipídio e de 2,2% a 4% de minerais (Hoseini; Khosravi-Darani; Mozafari, 2013). A composição química média da *A. platensis*, produzida pela empresa australiana Swiss Wellness Pty Ltd. (Melbourne, Austrália), consistiu em 63,60% proteína, 6,38% gordura, 17,51% carboidrato, 7,03% cinza e 5,48% umidade. (Alavi; Golmakani, 2017). Batista *et al.* (2017) determinaram a composição centesimal de *A. platensis* F & M-C256, originária da empresa italiana Archimede Ricerche S.r.l. (Camposso, Imperia, Itália), tendo encontrado $68,9 \pm 1,0\%$ de proteína, $12,8 \pm 0,2\%$ de carboidrato, $10,7 \pm 0,6\%$ de lipídio e $6,1 \pm 0,1\%$ de cinza. Essa e outras três espécies de microalgas foram incorporadas na formulação de biscoitos, os quais exibiram características potencial para se tornarem apreciados e consumidos como alimentos funcionais no futuro.

A. platensis apresenta uma ampla variedade de pigmentos fotossintéticos como a clorofila *a*, β -caroteno, luteína, ficocianina e aloficocianina, os quais são compostos bioativos que têm sido utilizados como corante natural em alimentos e cosméticos e como produto farmacêutico para o consumo animal e humano (Chen *et al.*, 2016; Soni; Sudhakar; Rana, 2017).

Além disso, a *A. platensis* apresenta propriedades que podem inibir a replicação viral, o desenvolvimento de câncer e ainda aumentar a produção de anticorpos (Belay, 2002; Khafaga; El-sayed, 2018). A administração por via oral de extrato aquoso quente de *A. platensis* ativou o sistema imune inato humano pelo aumento da produção de interferon e

aumentou a citotoxicidade das células exterminadoras naturais ou *natural killer cells* (NK) (Yeganeh; Teimouri; Amirkolaie, 2015).

Em organismos aquáticos cultivados, o uso de uma dieta enriquecida com a biomassa de *A. platensis* resultou em um aumento da atividade fagocítica e produção do ânion superóxido por células fagocitárias isoladas dos rins da carpa comum, *Cyprinus carpio* (WATANUKI *et al.*, 2006). A suplementação de dietas de peixes com *A. platensis* não apresentou efeitos negativos no crescimento dos indivíduos e ainda melhorou a pigmentação do filé (Teimouri; Amirkolaie; Yeganeh, 2013).

4.3.2 *Chlorella vulgaris*

A microalga *Chlorella vulgaris* possui a maior quantidade de clorofila entre os organismos fotossintetizantes conhecidos. Esta clorofícea tem aproximadamente 60% de proteína e possui vários minerais e vitaminas além de apresentar propriedade antioxidante (Bengwayan *et al.*, 2010).

A microalga *C. vulgaris* pertence ao Filo Chlorophyta, Classe Trebouxiophyceae, Ordem Chlorellales, Família Chlorellaceae e Gênero *Chlorella* (Kessler; Huss, 1992).

Filo Chlorophyta

Classe Trebouxiophyceae

Ordem Chlorellales

Família das Chlorellaceae

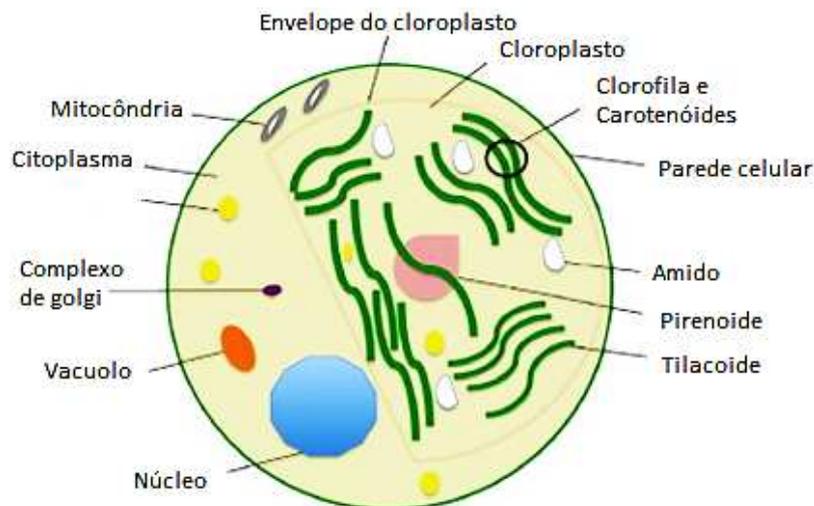
Gênero *Chlorella*

Espécie *C. vulgaris*

A espécie *C. vulgaris*, assim como outras espécies do Filo Chlorophyta, apresenta em sua composição uma abundância de carotenoides, como α - e β -caroteno, neoxantina, luteína, violaxantina e zeaxantina, os quais se encontram dispostos nas lamelas dos cloroplastos. O gênero *Chlorella* é microscópico e predominantemente de água doce, podendo existir em águas salgadas, na neve, no solo e sobre folhas de plantas terrestres (Krienitz *et al.*, 2004; Tabarsa *et al.*, 2015). A espécie *C. vulgaris* (Figura 2) possui forma esférica, medindo

de 2 a 10 µm de diâmetro, é uma microalga unicelular e eucariótica, fotossintetizante e com reprodução assexuada (Yamamoto *et al.*, 2004).

Figura 2 - Ultraestrutura esquemática da *Chlorella vulgaris* representando diferentes organelas.



Fonte: SAFI *et al.* (2014).

A biomassa seca da *Chlorella* é rica em proteína bruta (50-70%), lipídeos (7-20%), carboidratos (5-42%), fibras dietéticas (7-18%), vitaminas, minerais e pigmentos (Ahmad *et al.*, 2020; Bito *et al.*, 2020).

A *Chlorella* possui a maior quantidade de clorofila entre os organismos fotossintetizantes conhecidos. Esta clorofícea apresenta aproximadamente 60% de proteína, dezoito aminoácidos proteicos, possui vários minerais, vinte vitaminas, ácidos graxos poli-insaturados e fibras, além de apresentar propriedade antioxidante (Bengwayan *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2016; Ko; Kim; Jeon, 2012).

A *Chlorella* é considerada GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos, podendo ser utilizada como alimento sem causar risco à saúde humana (Henrard *et al.*, 2014).

A *Chlorella* é capaz de produzir um fitonutriente único conhecido como *fator de crescimento Chlorella* (FCC), o qual promove a regeneração de tecidos lesados, aumento do crescimento e divisão celular e aumento da imunidade (Kotrbaček; Doubek; Doucha, 2015). As espécies de *Chlorella* e seus extratos já demonstraram uma série de efeitos fisiológicos

como atividade antitumoral (Wang; Zhang, 2013), antioxidante (Chen *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2007), efeito sobre a ativação de macrófagos (Zhuang *et al.*, 2014), além de apresentar uma melhora na performance de crescimento e na atividade de enzimas digestivas em camarões *P. vannamei* (Pakravan *et al.*, 2018).

Contudo, a maioria das algas e plantas aquáticas contém cerca de 400 g kg⁻¹, ou mais, de carboidratos, dos quais uma ampla fração consiste em carboidratos estruturalmente complexos, que contribuem para a redução da digestibilidade (Maliwat *et al.*, 2017). Pakravan *et al.* (2018) relataram que camarões alimentados com dietas contendo 97,2 g kg⁻¹ de *Chlorella vulgaris* apresentaram uma redução na performance de crescimento, o que foi consistente com uma queda significativa na atividade das enzimas digestivas.

Vários estudos reportaram uma redução no crescimento quando os animais foram alimentados com dietas com altas inclusões de *C. vulgaris* em peixes (Lupatsch; Blak, 2013; Xu *et al.*, 2014) e camarões (Maliwat *et al.*, 2017; Pakravan *et al.*, 2018).

4.3.3 *Conticribra weissflogii*

As diatomáceas são o grupo de microalgas predominantes no ecossistema marinho, contribuindo com cerca de 40% da fixação global de carbono e servindo como alimento para o zooplâncton (Armbrust, E. V. *et al.*, 2004). Anteriormente, a microalga *Conticribra weissflogii* era conhecida como *Thalassiosira weissflogii* (Figura 3) (Stachura-Suchoples; Williams, 2009).

Figura 3 - Microscopia óptica da *Conticribra weissflogii* do cepáreo do Laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC.



Fonte: Autor.

De acordo com o Algae Base (2023), o gênero *Conticribra* tem 4 espécies taxonomicamente aceitas. A classificação taxonômica da diatomácea *C. weissflogii* está apresentada abaixo:

Filo Bacillariophyta

Classe Mediophyceae

Ordem Thalassiosirales

Família Thalassiosiraceae

Gênero Conticribra

Espécie *C. weissflogii*

Na aquicultura, a *C. weissflogii* é utilizada para alimentar camarões nas fases iniciais de desenvolvimento larval (Ali *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, a diatomácea *Conticribra* tem sido usado para substituir a *Chaetoceros muelleri* nas larviculturas de camarões *P. vannamei* devido a essa microalga apresentar uma composição nutricional superior a da *Chaetoceros* e, dessa forma, ela pode promover um melhor crescimento das larvas e melhorar a taxa de sobrevivência dos animais cultivados (Kiatmetha *et al.*, 2011; Tam *et al.*, 2021).

A *C. weissflogii* apresenta um conteúdo de proteína e ácidos graxos totais (EPA e DHA) superior à apresentada pela *C. muelleri*. Isso leva a um incremento dos ácidos graxos totais das larvas alimentadas com a *C. weissflogii* comparado com as espécies de *Chaetoceros* (Kiatmetha *et al.*, 2011).

A diatomácea *C. weissflogii* é usada para alimentar camarões e larvas de crustáceos em larviculturas. É preferível usar esta microalga para este propósito do que as outras diatomáceas comercialmente disponíveis, como as *Chaetoceros* e *Tetraselmis*, por conta do seu maior tamanho o que resulta que ela pode ser usada em estágios mais avançados do desenvolvimento larval (Ali *et al.*, 2019).

Pooljun *et al.* (2022) demonstraram que o β -glucano da diatomácea marinha *C. weissflogii* pode melhorar o crescimento e imunidade do camarão banana (*Penaeus merguensis*).

Tang *et al.* (2020) relataram que larvas de camarões *Penaeus monodon* alimentados com *C. weissflogii* aumentaram a atividade enzimática da lipase e da pepsina, e a porcentagem de metamorfoses, o que resultou em um aumento da digestão e da capacidade metabólica das larvas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cultivo das microalgas *Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* e *Conticribra weissflogii*

5.1.1 Cultivo da microalga *Arthrospira platensis*

A microalga *A. platensis* foi cultivada em meio Venkataraman (Venkataraman; Becker, 1985) modificado, constituído por reagentes agrícolas amplamente disponíveis e de baixo custo, tendo como fonte de nitrogênio a ureia ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e superfosfato triplo $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{H}_2\text{O}]$ ($0,01 \text{ g L}^{-1}$), como fonte de fósforo, mantendo-se o cultivo unialgal com células em um bom estado fisiológico.

O sistema de produção consistiu em um tanque de ferro-cimento circular com 6.000 L de volume útil. O tanque era disposto em ambiente externo, ao lado do Centro de Biotecnologia Aplicado a Aquicultura (CEBIAQUA) do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP) da Universidade Federal do Ceará (UFC), em local ensolarado, com iluminância de aproximadamente $1.500 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Uma bomba d'água submersa com vazão de 4.000 L h^{-1} foi utilizada para fazer a recirculação constante da cultura, homogeneizando o conteúdo do tanque, e para realizar a filtração (Figura 4).

Figura 4 - Sistema de produção da microalga *Arthrospira platensis* no CEBIAQUA, no Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.



Fonte: Autor. Vista de parte da estrutura de ferro-cimento onde a *A. platensis* foi produzida (A). Vista da *A. platensis* em circulação no tanque de cultivo (B).

As condições de cultivo da *A. platensis* foram salinidade 10 e pH 10, as quais foram mantidas pela adição de sal marinho e bicarbonato de sódio, respectivamente, e temperatura $32^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ às 14 h (horário local).

A densidade do cultivo foi acompanhada diariamente pela leitura da absorvância no comprimento de onda de 680 nm em espectrofotômetro (HACH DR2700). Leituras superiores a 0,800 indicaram densidade ideal para obtenção da biomassa da microlaga, momento em que foi realizado o processo de filtração, usando malha de náilon de 60 μm , tipo de filtro comercialmente denominado *bag*.

Após a filtração, a biomassa foi lavada abundantemente com água corrente e, posteriormente, com água destilada. A biomassa foi transferida para recipientes plásticos e levado para estufa para secar a 50°C durante 24 h.

Posteriormente, a biomassa seca foi macerada e armazenada em um recipiente.

5.1.2 Cultivo das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Conticribra weissflogii*

As microalgas *C. vulgaris* e *C. weissflogii* foram obtidas no cepário, onde a coleção de microalgas é mantida, e cultivadas no Laboratório de Planctologia do DEP.

As cepas foram mantidas em meio padrão Guillard f/2 (Guillard, 1975) no qual foram adicionados 1 mL L^{-1} das soluções estoque dos macronutrientes nitrato de sódio, fosfato de

sódio e silicato de sódio, da solução de metais traço (micronutrientes) e 0,5 mL L⁻¹ da solução de vitaminas (TABELA 1 e 2).

Tabela 1 - Composição do meio padrão Guillard f/2.

Solução	Componentes	Solução estoque (g L ⁻¹)	Quantidade no meio de cultura (mL L ⁻¹)
1	Nitrato de sódio	75	1,0
2	Fosfato de sódio	5	1,0
3	Silicato de sódio	30	1,0
4	Solução de vitamina	*	0,5
5	Metais traço	**	1,0

Fonte: Autor. * 50 mL de água destilada acrescidas de duas ampolas de vitamina. ** A formulação da solução de metais traço está representada na tabela .

Tabela 2 - Composição da solução de metais traço do meio Guillard f/2.

Componentes	Solução estoque (g L ⁻¹)	Concentração na solução de metais traço
Cloreto de ferro		3,15 g L ⁻¹
Na ₂ EDTA		4,36 g L ⁻¹
Sulfato de cobre	9,8	1,0 mL L ⁻¹
Molibdato de sódio	6,3	1,0 mL L ⁻¹
Sulfato de zinco	22	1,0 mL L ⁻¹
Cloreto de cobalto	10	1,0 mL L ⁻¹
Cloreto de manganês	180	1,0 mL L ⁻¹

Fonte: Guillard (1975).

O meio de cultura para a *C. vulgaris* foi preparado com água destilada, enquanto o meio para a *C. weissflogii* foi feito com água salobra com salinidade 20.

Os reatores de vidro e o meio de cultura foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 120 °C para evitar contaminação biológica. Os reatores plásticos foram esterilizados com cloro, inicialmente, e, posteriormente, com água e sabão. Por último, os reatores foram enxaguados com água destilada.

As condições ambientais foram mantidas constantes ao longo do cultivo, com temperatura de 28 ± 1 °C, luminosidade em torno de $60 \mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, com duas lâmpadas de LED de 40 W dispostas em paralelo, e aeração fornecida por um soprador de ar com fluxo de $3,0 \pm 1,0$ L ar min^{-1} .

As microalgas foram cultivadas de forma estacionária, em recipientes com 12 a 18 L de volume útil (Figura 5).

Figura 5 - Cultivo das microalgas *C. weissflogii* e *C. vulgaris* em meio de cultivo GUILLARD f/2.



Fonte: Autor. A: microalgas *C. weissflogii*; B: *C. vulgaris*.

Para a colheita da biomassa da *C. vulgaris* e da *C. weissflogii*, o volume do cultivo foi submetido a uma floculação química induzida pelo aumento do pH do meio, utilizando uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2 N (Chen *et al.*, 2011) e, após a sedimentação da biomassa, o volume de água sem microalgas era retirado e uma nova água era colocada no recipiente. Este processo de lavagem foi realizado sucessivamente para retirada do sal e do NaOH (Figura 6).

Figura 6 - Floculação química (NaOH, 2 N) da *C. vulgaris* para obtenção da biomassa algal.



Fonte: Autor. Cultivo da *C. vulgaris* logo após a aplicação do NaOH (A) e após a sedimentação da microalga entre as lavagens (B).

A biomassa coletada foi transferida para recipientes plásticos e levado para estufa para secar a 50 °C durante 24 h. Posteriormente, a biomassa seca foi armazenada em um recipiente e mantida em um freezer a -18 °C.

5.2 Preparação das dietas

Para a elaboração da ração utilizada no experimento, utilizou-se a ração comercial para camarões com 40% de proteína bruta a qual foi triturada e utilizada para a confecção das rações utilizadas no experimento.

Para a elaboração das dietas experimentais, inicialmente dissolveu-se gelatina em pó incolor e sem sabor em água quente. Após completa dissolução da gelatina, acrescentou-se a biomassa da microalga e, em seguida, misturou-se a solução quente à ração, de modo que as proporções dos constituintes da ração estão demonstradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição (%) dos constituintes da ração utilizadas para alimentar os camarões.

Tratamento	Ração comercial	Gelatina em pó	<i>A. platensis</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>C. weissflogii</i>
Controle	94	6	0	0	0
Arthrospira	93,5	6	0,5	0	0
Chlorella	93,5	6	0	0,5	0
Conticribra	93,5	6	0	0	0,5

Fonte: Autor. Controle: controle, sem suplementação de microalga; Arthrospira: 0,5% de suplementação com *A. platensis*; Chlorella: 0,5% de suplementação com *C. vulgaris*; Conticribra: 0,5% de suplementação com *C. weissflogii*

Posteriormente, os peletes foram confeccionados artesanalmente, em uma peletizadora manual, e levados secar em estufa a 50 °C por 24h. A ração obtida foi armazenada em freezer a -18 °C até o início do experimento (7 meses).

5.3 Local de cultivo dos camarões

O cultivo dos camarões marinhos foi realizado em um sistema de cultivo em área aberta no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA), situado no Centro de Estudos em Aquicultura Costeira (CEAC) do LABOMAR, UFC.

5.4 Unidades experimentais e qualidade de água

Todas as estruturas utilizadas no cultivo dos animais (tanques de cultivo, bandejas de alimentação, tubulação de água e aeração e os tubos de aeração) foram limpos e desinfetados. Primeiramente, os tanques foram escovados com detergente clorado alcalino diluído (1 L de sabão para 100 L de água doce). Em seguida, os tanques foram lavados com água doce para remoção do sabão e cloro.

Foi aplicado um desincrustante à base de ácido sulfúrico (1 L de ácido sulfúrico para 50 L de água), o qual foi pulverizado nas paredes e fundo dos tanques e nas linhas de abastecimento de água e drenagem e deixado em repouso por 24 h. Posteriormente, foi utilizado um desinfetante à base de ácido peracético (1 L de desinfetante para 500 L de água). Por último, os tanques foram lavados com água doce e, em seguida, completamente preenchidos com água salobra previamente filtrada com areia e desinfetada com cloro.

Para controlar os compostos nitrogenados, a água de cultivo foi fertilizada antes da estocagem dos camarões para se obter uma relação C:N de 15:1. Para isso, foi aplicado melaço de cana-de-açúcar líquido juntamente com ração comercial moída para camarões (35% de proteína bruta, PB) na proporção de 1:1 (20 g m⁻³) por um período de três dias. O sistema de aeração foi ligado no período de fertilização, antes da estocagem dos camarões.

A aeração artificial foi fornecida por dois compressores radiais de ar com 7,5 cv de potência cada (modelo CR-9, Indústria Brasileira de Máquinas e Equipamentos – IBRAM, São Paulo, SP) que ficaram ligados de forma contínua até o fim do cultivo.

Foram realizadas trocas parciais de água (30%), uma vez por semana, a fim de manter uma qualidade de água adequada para os animais.

Para o presente trabalho foram utilizados 16 tanques de polietileno circulares com volume útil

de 0,5 m³. Os tanques eram cobertos permanentemente com uma tampa plástica rígida, com abertura para o sistema de aeração e para o sistema de alimentação mecânica (Figura 7).

Figura 7 - Tanques de cultivo experimental dos camarões.



Fonte: Autor.

Os animais foram divididos em quatro tratamentos, de acordo com a microalga suplementada na ração: **CO**: controle, sem suplementação de microalga, **AP**: 0,5% de suplementação com *A. platensis*, **CV**: 0,5% de suplementação com *C. vulgaris* e **CW**: 0,5% de suplementação com *C. weissflogii*. Todos os tratamentos tiveram quatro repetições e uma duração de 43 dias.

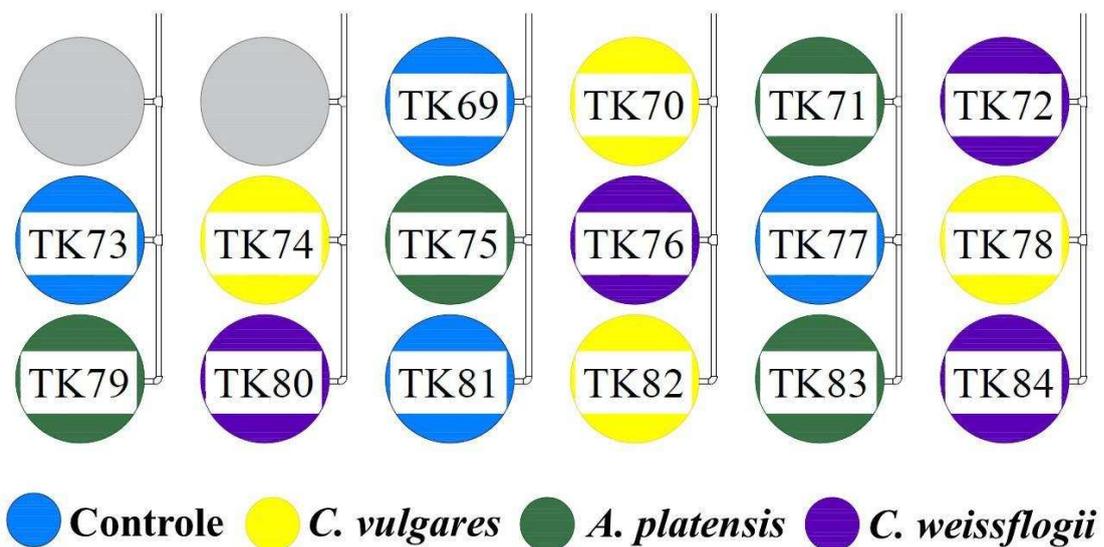
Os tanques dos tratamentos foram dispostos segundo o delineamento inteiramente casualizado, a fim de evitar vícios amostrais.

5.5 Pós-larvas e povoamento dos tanques

As pós-larvas (PL15) do camarão-branco, *Penaeus vannamei*, foram adquiridas de uma larvicultura comercial (Aquacrusta Marinha Ltda., Acaraú, Brasil). Os animais foram transportados em sacos plásticos, dentro de caixas de papelão, diretamente para o CEAC. Na chegada, as pós-larvas foram submetidas à aclimação da temperatura, colocando as sacolas plásticas transportadoras em dois tanques-berçário de 23,86 m³ (4,5 x 1,5 m de diâmetro x profundidade; 15,9 m² área de fundo) por cerca de 30 minutos. Os camarões foram estocados sob uma densidade aproximada de 0,4 PL L⁻¹ (média de 10.693 camarões tanque⁻¹). Durante o período de berçário, os camarões foram alimentados com uma dieta comercial (35% de ingredientes marinhos) formulada para conter 40% de PB e 8% de gordura.

Antes da estocagem os camarões foram contados usando um dispositivo inteligente portátil específico para avaliação rápida da população (*XperCount2*, *XpertSea*, Québec, Canadá) e sua biomassa úmida determinada usando uma balança eletrônica com precisão de 0,001 g. Os camarões foram capturados com redes-peneira e selecionados por peso, removendo camarões pequenos e grandes, selecionando animais mais homogêneos. Um total de 768 camarões de $0,43 \pm 0,02$ g (Coeficiente de Variação 5%, 0,40 – 0,48 g; $P > 0,05$, *One-Way* ANOVA) foram transferidos para 16 tanques externos sob 48 camarões tanque⁻¹, conforme a distribuição apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Representação da distribuição dos tanques na fase de cultivo dos camarões.



Fonte: Autor.

Os camarões foram aclimatados durante duas semanas com ração comercial 40% PB (*Density 40*, Neovia Nutrição e Saúde Animal Ltda., São Lourenço da Mata, Brasil). Nos 7 dias iniciais, os camarões foram alimentados com um pellet de 1 mm de diâmetro e, em seguida, os animais foram alimentados com pellets de 1,2 mm antes de serem alimentados com as rações experimentais.

5.6 Manejo alimentar e qualidade de água

Após o povoamento dos tanques utilizados no experimento, os camarões foram alimentados exclusivamente em bandejas de alimentação com 14,3 cm de diâmetro e bordaduras com 3,5 cm de altura. As bandejas foram instaladas no fundo de cada tanque, uma

unidade por tanque. Em cada horário de alimentação, as bandejas foram verificadas quanto a restos de ração ou fezes que foram coletados para descarte antes da entrega da ração. O fornecimento da ração ocorreu nos seguintes horários: 1ª refeição: 07:00 h; 2ª refeição: 10:00 h; 3ª refeição: 13:00 h; 4ª refeição: 16:00 h. As rações diárias foram divididas em 25, 15, 15 e 45% no 1º, 2º, 3º e 4º períodos de alimentação, respectivamente.

As bandejas de alimentação foram inspecionadas diariamente, nos períodos de alimentação, para verificar a presença de animais mortos os quais foram retirados e descartados. Os animais mortos não foram repostos durante todo o período de cultivo.

Os parâmetros de qualidade da água (pH, temperatura e salinidade) foram medidos uma vez ao dia por volta das 13:30 h em todos os tanques. A salinidade média da água, pH e temperatura atingiram $24 \pm 2,03 \text{ g L}^{-1}$ (18-34, n = 680), $8,5 \pm 0,2$ (7,9-8,7, n = 680) e $30,0 \pm 1,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (26,4-32,9 $^\circ\text{C}$, n = 680). O oxigênio dissolvido foi mantido saturado com aeração contínua no fundo do tanque. A partir do dia 30, a água foi trocada apenas uma vez por semana durante o cultivo, drenando cerca de 30% do volume total de água do fundo do tanque e substituindo-o por nova água salobra filtrada com areia, para manter a qualidade de água para os animais.

5.7 Parâmetros zootécnicos

Ao fim do período experimental, os animais foram coletados, contados e pesados para calcular a sobrevivência e performance de crescimento nos respectivos tratamentos. Foram determinados o ganho de peso, o fator de conversão alimentar (FCR) e a taxa de crescimento específico dos diferentes tratamentos.

Os camarões foram aclimatados durante duas semanas e, após esse período, foram cultivados por 43 dias. Na despesca, todos os camarões vivos foram coletados, contados e pesados individualmente em balança com precisão de 0,01 g. Com esses dados, os seguintes parâmetros foram determinados conforme as equações:

1. Peso corporal final (g);
2. *Sobrevivência final (%)* = $\left(\frac{\text{número final de camarões}}{\text{número inicial de camarões}} \right) \times 100\%$
3. *Consumo aparente de ração (g de ração camarão⁻¹)* = $\left(\frac{\text{quantidade total de ração seca ingerida}}{\text{número inicial de camarões}} \right)$
4. *Fator de conversão alimentar (FCA)* = $\left(\frac{\text{consumo de ração aparente por tanque}}{\text{biomassa adquirida por tanque}} \right)$

$$5. \textit{ Produtividade final (g m}^2\text{)} = \left(\frac{\textit{ biomassa final (g)}}{\textit{ área do tanque (m}^2\text{)}} \right)$$

5.8 Coleta das amostras

Cinco animais de cada tanque foram amostrados no início do experimento (dia 0), após cinco dias de cultivo e ao fim do experimento (43 dias), armazenados em tubos contendo álcool etílico 70% e imediatamente transportados até o Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM), no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR).

Os animais coletados tiveram o hepatopâncreas retirado e acondicionados em *pools* correspondentes a cada tratamento e repetição e foram armazenado a -80 °C até posterior utilização.

5.9 Extração do RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído segundo a metodologia descrita por Sambrook (1987). A extração se deu a partir de 100 mg do hepatopâncreas homogeneizado de cada *pool*, com o uso do reagente TRIzol (Invitrogen®), segundo as instruções do fabricante. O RNA total extraído foi tratado com Dnase I por incubação a 37 °C por 15 min.

A quantidade e a concentração do RNA foi estimadas espectrofotometricamente com o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). A qualidade também foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 2%.

O cDNA foi sintetizado com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies®) em um volume de 20 µL de RT Buffer (10x), 0,8 µL de dNTPs mix (25x), 2 µL de RT random primers (10x), 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U) e 1 µL de RNA total. Para validar a RT-qPCR, cada reação foi operada em duplicata, considerando um desvio padrão menor que 0,3. O cDNA foi armazenado em *freezer* a -20°C até a sua utilização para as análises de expressão gênica por RT-qPCR.

5.10 Expressão relativa dos genes imunológicos

A expressão relativa dos genes Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF), Lisozima (LYZ), Fator de Crescimento Transformante Beta (TGF-β), Dicer, pró-fenoloxidase (proPO),

crustina e peneidina-3a foram analisadas por RT-qPCR, utilizando o reagente *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix – UDG (Invitrogen®)*. A β -actina e o Fator de Elongação 1 α (EF-1 α) foram utilizados como genes de referência, com base na média geométrica dos seus valores de CT (LIANG *et al.*, 2019). O cálculo do nível de expressão relativa de cada gene foi feito pelo método 2- $\Delta\Delta$ CT (Schmittgen; Livak, 2008).

A otimização da PCR e a expressão relativa do mRNA dos genes TNF, LYZ, TGF- β , DICER, proPO, Crustin e peneidin-3a foram analisados baseados na curva padrão de *melting* com diluições do cDNA em série. As sequências dos primers utilizados estão discriminados na Tabela 2.

Tabela 4 - Lista de primers utilizados na análise de expressão gênica.

Primer	Sequência (‘5-3’)	Referência
β -actina-F	GACCGAGGCTCCCCTTCAA	Feijó <i>et al.</i> (2014)
β -actina-R	TCTCGAACATGATCTGTGTCAT	
EF-1 α -F	CCTATGTGCGTGGAGACCTTC	Gao <i>et al.</i> (2017)
EF-1 α -R	GCCAGATTGATCCTTCTTGTTGAC	
TNF-F	AAAGAGGAACGTGGTCATGG	Rahimnejad <i>et al.</i> (2018)
TNF-R	CACTCCTTTCCCCACTGTGT	
LYZ-F	TGTTCCGATCTGATGTCC	Luo <i>et al.</i> (2021)
LYZ-R	GCTGTTGTAAGCCACCC	
TGF- β -F	AACCATGCCCTTGTGCAAAC	Rahimnejad <i>et al.</i> (2018)
TGF- β -R	CTTTGGGGGAACCTCGGTC	
DICER-F	CCGGAGATAGAACGGTTCAGTG	Yi <i>et al.</i> (2014)
DICER-R	CGATAATTCCTCCCAACACCTG	
proPO-F	CGGTGACAAAGTTCCTCTTC	Chen <i>et al.</i> (2020)
proPO-R	GCAGGTCGCCGTAGTAAG	
Crustina-F	ACGAGGCAACCATGAAGG	Yang <i>et al.</i> (2015)
Crustina-R	AACCACCACCAACACCTAC	
Penaeidina-3a-F	CACCCTTCGTGAGACCTTTG	Wang <i>et al.</i> (2010)
Penaeidina-3a-R	AATATCCCTTTCCCACGTGAC	

Fonte: Autor.

5.11 Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios realizados no experimento foram submetidos inicialmente a uma análise de normalidade e homogeneidade e, posteriormente, a análise de variância com fator único (ANOVA) e, no caso de diferenças significativas no nível de 5%, foi utilizado o teste de Tukey para comparação das médias. Os gráficos foram elaborados com auxílio do SigmaPlot 12.5.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

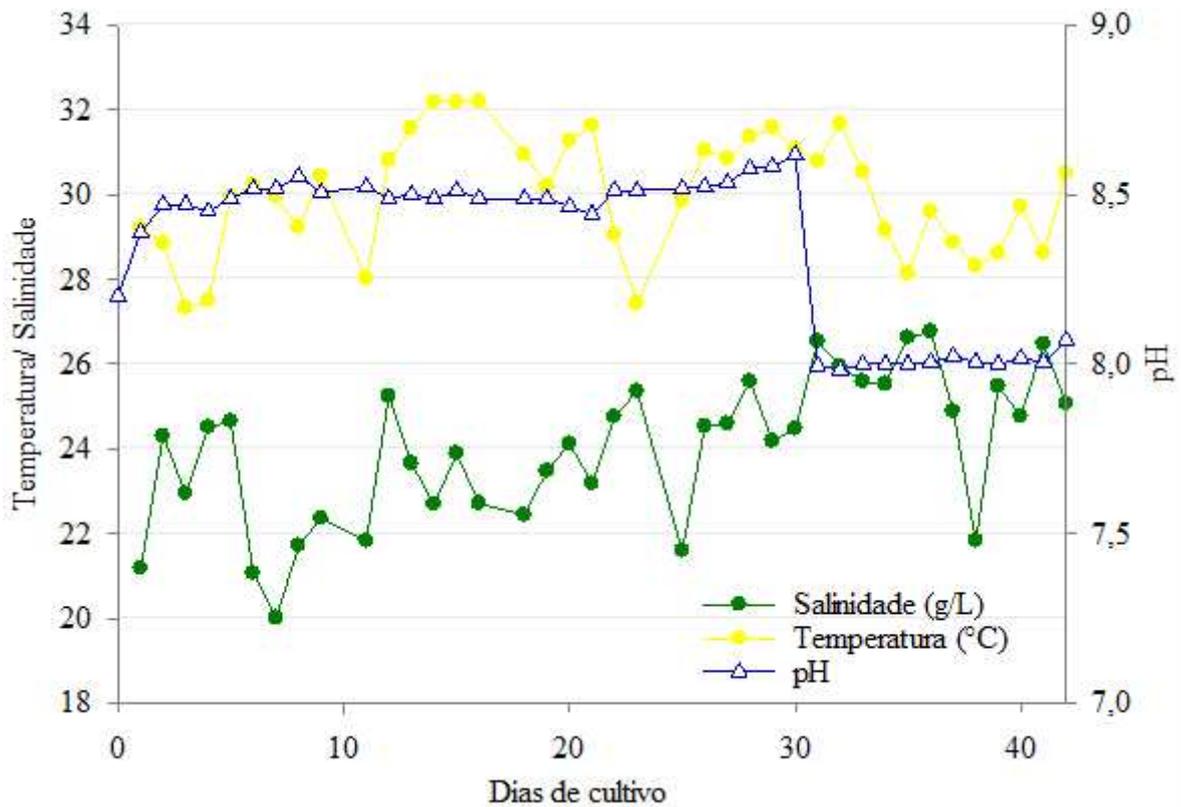
6.1 Qualidade de água

É de fundamental importância manejar o ambiente de cultivo de forma eficiente e racional e, para isso, é necessário um monitoramento sistemático dos parâmetros de qualidade de água (Sá, 2012).

Os camarões são animais que não controlam ativamente a sua temperatura corporal, desse modo, esta varia de acordo com as oscilações de temperatura do ambiente. A temperatura é um parâmetro físico de grande importância para o crescimento de animais pecilotérmicos, pois apresenta influencia direta na velocidade do metabolismo e na utilização dos nutrientes que compõem a dieta (Guerreiro *et al.*, 2014).

O Gráfico 1 mostra as médias dos valores dos parâmetros de qualidade de água (temperatura, salinidade e pH). Os parâmetros salinidade e temperatura variaram ao longo do período, principalmente, em decorrência de o período de cultivo se dar dentro do período chuvoso e das trocas parciais de água realizadas. A salinidade subiu de uma média inicial de 20,18 g L⁻¹ após a estocagem dos camarões para 25,06 g L⁻¹ no último dia de cultivo. Esta variação é consistente com o acúmulo de sais devido ao processo de evaporação. A temperatura da água variou razoavelmente ao longo do cultivo com alguns picos maior ou igual a 32 °C nos dias 14, 15 e 21. O pH foi mantido acima de 8,0 durante todo o período de cultivo, com uma média em torno de 8,5 na maior parte do período, com uma redução para cerca de 8,0 do dia 31 até o fim do cultivo (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Variações diárias de salinidade (g L⁻¹), temperatura (°C) e pH ao longo do período de cultivo (42 dias). Cada valor representa a média de 16 leituras diárias (13:30h).



Fonte: Autor.

De modo geral, os parâmetros de qualidade da água mensurados (Gráfico 1) foram mantidos dentro dos níveis exigidos para o máximo desempenho zootécnico dos camarões *P. vannamei* (Nunes, 2002; Guerreiro *et al.*, 2014).

6.2 Desempenho zootécnico dos camarões

A Tabela 5 mostra a performance de crescimento e de utilização da alimentação dos camarões alimentados com as dietas suplementadas com as diferentes microalgas. Foi possível verificar que as dietas suplementadas com as diferentes microalgas (*Chlorella*, *Arthrospira* e *Contricriba*) apresentaram melhoras significativas para os parâmetros sobrevivência e FCA em comparação com o grupo controle negativo (Controle, $p < 0,05$; Tabela 5).

Tabela 5 - Desempenho zootécnico de camarões *L. vannamei* cultivados em tanques em ambiente externo durante 43 dias.

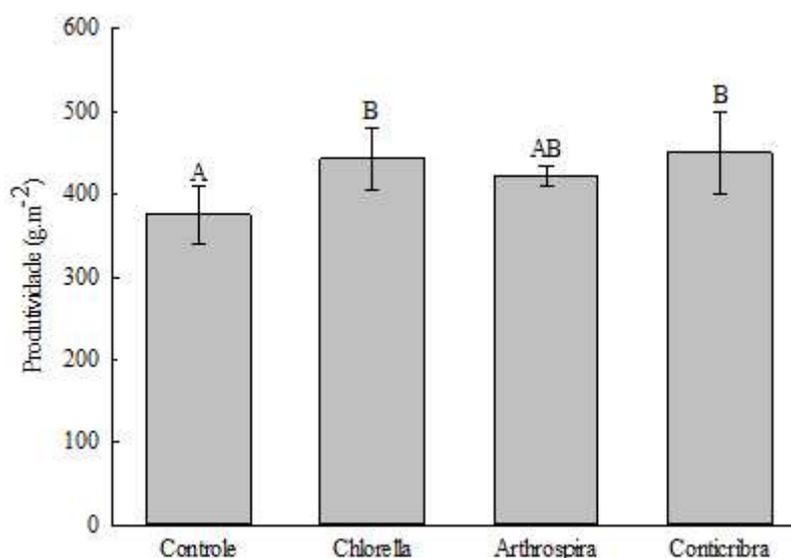
Dietas	Parâmetros de Desempenho Zootécnico				
	PCF (g)	S (%)	PF (g m ⁻²)	CRA (g de ração camarão ⁻¹)	FCA
Controle	8,24 ± 0,93	67,19 ± 3,82 ^A	375,17 ± 34,18 ^A	9,81 ± 0,51	1,80 ± 0,20 ^A
Chlorella	8,00 ± 1,57	82,81 ± 5,23 ^B	443,58 ± 37,35 ^B	9,54 ± 0,48	1,47 ± 0,20 ^B
Arthrospira	7,55 ± 0,78	83,33 ± 6,67 ^B	423,18 ± 12,02 ^{AB}	9,14 ± 0,58	1,46 ± 0,11 ^B
Conticribra	8,09 ± 0,57	81,77 ± 5,76 ^B	450,44 ± 49,74 ^B	9,76 ± 0,37	1,50 ± 0,30 ^B

Fonte: Autor. PCF: peso corporal final; S: sobrevivência; PF: produtividade final; CRA: consumo de ração aparente; FCA: fator de conversão alimentar.

Já os parâmetros peso corporal final e consumo de ração aparente não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos testados.

Os camarões alimentados com as dietas *Chlorella* e *Conticribra* apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) do parâmetro produtividade final em relação ao grupo controle negativo (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Produtividade final dos camarões alimentados com as diferentes dietas experimentais.



Fonte: Autor.

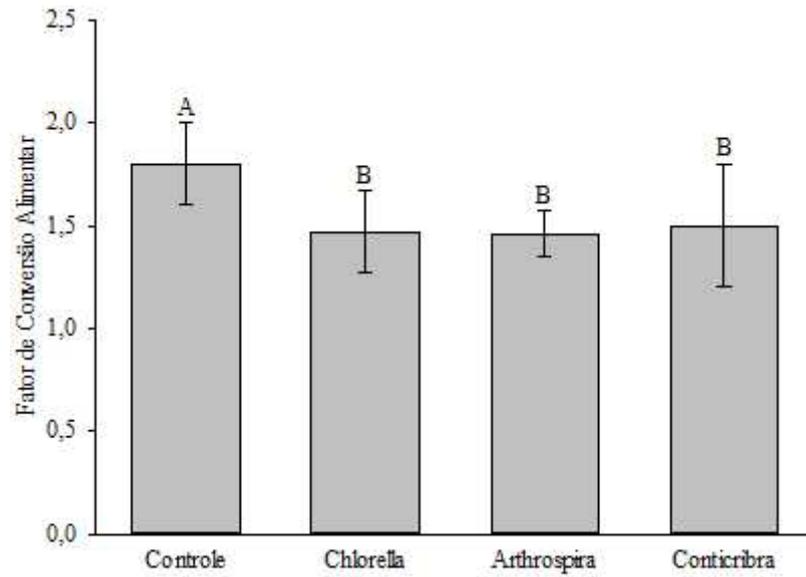
A inclusão de *A. platensis* na dieta pode melhorar a condição de saúde humana e animal ao alterar a abundância e a composição da microbiota do intestino (Finamore *et al.*, 2017). Adel *et al.* (2016) relataram que a administração de dietas suplementadas com *A. platensis* regularam a composição da microbiota do intestino do esturjão (*Huso huso*) ao aumentar a abundância de bactérias benéficas.

Lin *et al.* (2010) reportaram que a imersão ou injeção do extrato aquoso de *A. platensis* em camarões *P. vannamei* resultou em uma melhora dos parâmetros de crescimento dos animais. Na mesma linha, Sharawy *et al.* (2020) concluíram que o uso de biomassa seca da microalga verde *Tetraselmis suecica* como aditivo alimentar para *P. vannamei* melhorou a performance de crescimento e a utilização da dieta.

Pooljun *et al.* (2022) alimentaram camarões *Penaeus merguensis* com dietas suplementadas com β -glucanos das microalgas marinhas *Chaetoceros muelleri* e *C. weissflogii* durante 30 dias. Os animais alimentados com os β -glucanos apresentaram uma melhora no peso final, ganho de peso diário, ganho de peso e FCA em relação à dieta controle. Além disso, os animais desafiados com *Vibrio parahaemolyticus* após 14 dias de cultivo que foram alimentados com as dietas contendo os β -glucanos da *C. muelleri* (82,2%) e da *C. weissflogii* (77,8%) apresentaram uma sobrevivência significativamente maior que a do grupo controle (51,1%).

Os camarões alimentados com as dietas suplementadas com as microalgas apresentaram uma melhora significativa ($p < 0,05$) no parâmetro FCA em relação ao grupo Controle (Gráfico 3).

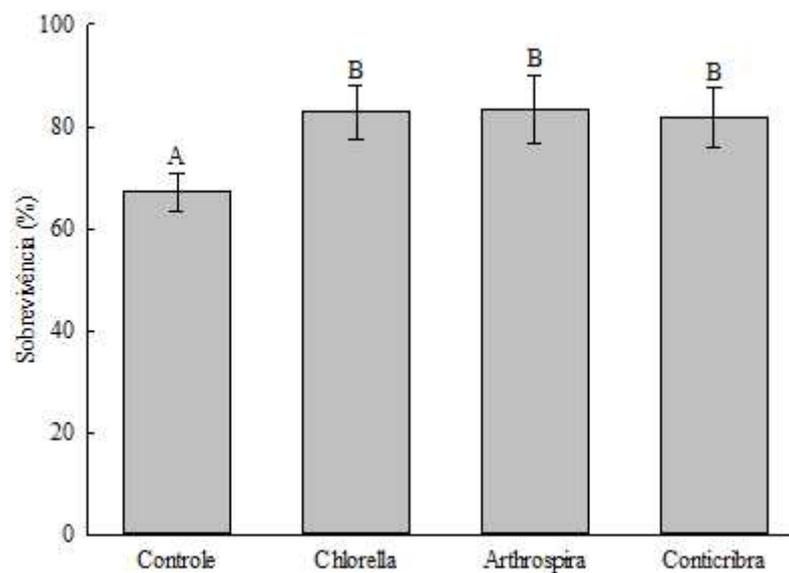
Gráfico 3 - Fator de conversão alimentar dos camarões alimentados com as diferentes dietas experimentais.



Fonte: Autor.

Os camarões alimentados com as diferentes microalgas apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da sobrevivência em relação ao grupo Controle (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Sobrevivência dos camarões alimentados com as diferentes dietas experimentais.



Fonte: Autor.

A média da sobrevivência do *P. vannamei* em condições de cultivo semelhantes

ao do presente estudo fica entre 75 e 80% (Laramore *et al.*, 2001; FAR *et al.*, 2009; Sharawy *et al.*, 2022). A sobrevivência (%), Gráfico 4) dos camarões alimentados com as dietas *Chlorella* ($82,81 \pm 5,23$), *Arthrospira* ($83,33 \pm 6,67$) e *Conticribra* ($81,77 \pm 5,76$) apresentaram um incremento significativo em relação a dieta Controle ($67,19 \pm 3,82$).

Sharawy *et al.* (2022) relataram que não houve diferença significativa da sobrevivência de *P. vannamei* alimentados com ração suplementada com a biomassa seca da *A. platensis* (1%) em relação ao grupo controle, porém houve um aumento significativo deste parâmetro em relação aos grupos alimentados com essa microalga processada na forma de nanopartículas. Além disso, a resposta foi dependente do nível de inclusão das nanopartículas.

Vários tipos de microalga, incluindo *Nanofrustulum* sp., *Chlorella* sp., *Isochrysis* sp. e *Tetraselmis* sp. etc., foram fornecidas como fonte alternativa de proteína no lugar de farinha de peixe para peixes carnívoros e camarões e não apresentaram impacto negativo no desempenho zootécnico (Kiron *et al.*, 2012; Tulli *et al.*, 2012; Tibaldi *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2020).

Contudo, o presente trabalho focou em determinar o impacto da suplementação das microalgas *C. vulgaris*, *A. platensis* e *C. weissflogii* sobre os parâmetros zootécnicos e expressão de genes imuno-relacionados não como uma fonte alternativa de proteína, mas como uma suplementação no nível de 0,5%.

Este nível de inclusão das microalgas foi devido a possibilidade de uma maior aplicação pela indústria em face da dificuldade de obtenção da matéria prima e do elevado preço da biomassa das microalgas, o que pode inviabilizar a utilização dessas matérias primas em níveis mais elevados de utilização.

Os resultados do presente estudo demonstraram que as dietas suplementadas com a biomassa seca das microalgas utilizadas melhoraram os parâmetros zootécnicos, especificamente a sobrevivência, a produtividade final e o FCA. No presente estudo, a melhora desses parâmetros pode ser atribuído:

- a) Aos benefícios dos compostos antioxidantes presentes nas microalgas, como as ficobiliproteínas, carotenóides e outros compostos que combatem os radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo (Chen *et al.*, 2016; Hassaan *et al.*, 2021);
- b) Aos promotores de crescimentos e compostos bioativos, como o FCC e os β -glucanos (Badwy; Ibrahim; Zeinhom, 2008; Pakravan *et al.*, 2018; Pooljun *et al.*, 2022);
- c) Ao estímulo ao crescimento de bactérias benéficas no trato digestório dos camarões e a maior produção de enzimas digestivas endógenas (Anand *et al.*, 2013; Chen *et*

al., 2024), que, mesmo com baixas concentrações das microalgas e seus componentes no intestino, pode desencadear a produção de enzimas (Reitan; Rainuzzo, 1993; Shi *et al.*, 2017);

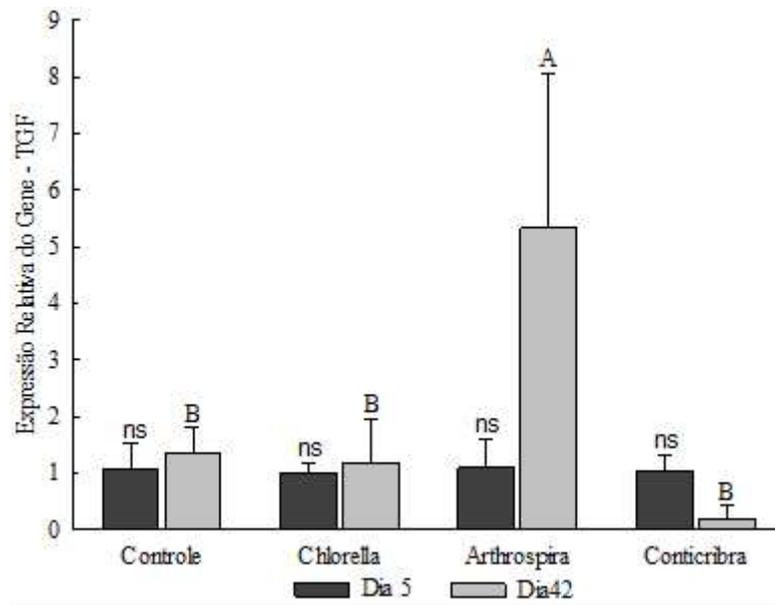
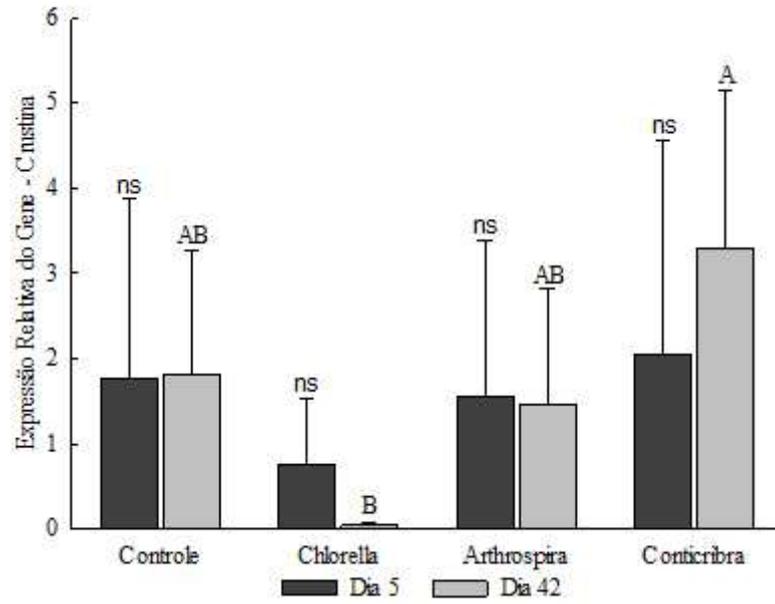
- d) A presença de compostos imunoestimulantes, como PS, LPS na *A. platensis*, β -glucanos na *C. weissflogii* e de outros compostos do extrato da *C. vulgaris* que apresentam ação imunomoduladora, aumentando a imunidade inata e a resistência contra infecções (CHEN *et al.*, 2016; PILOTTO *et al.*, 2019; POOLJUN *et al.*, 2022).

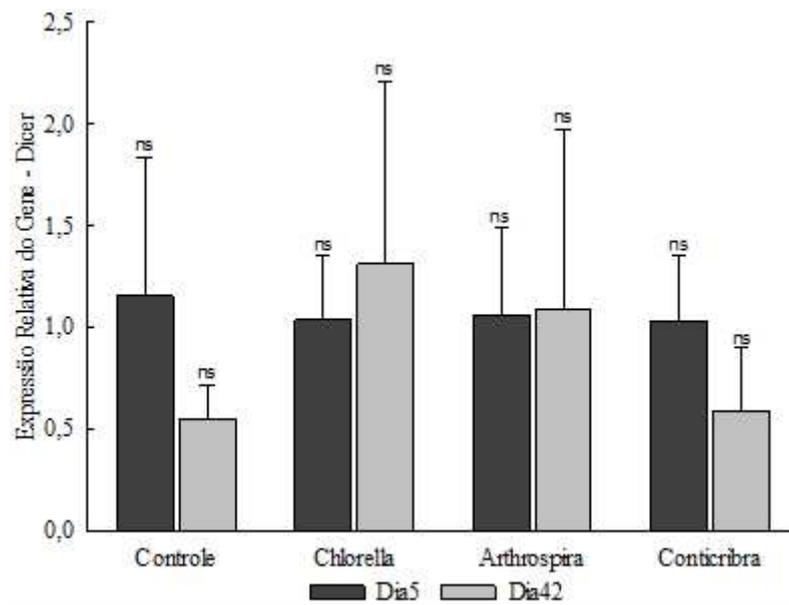
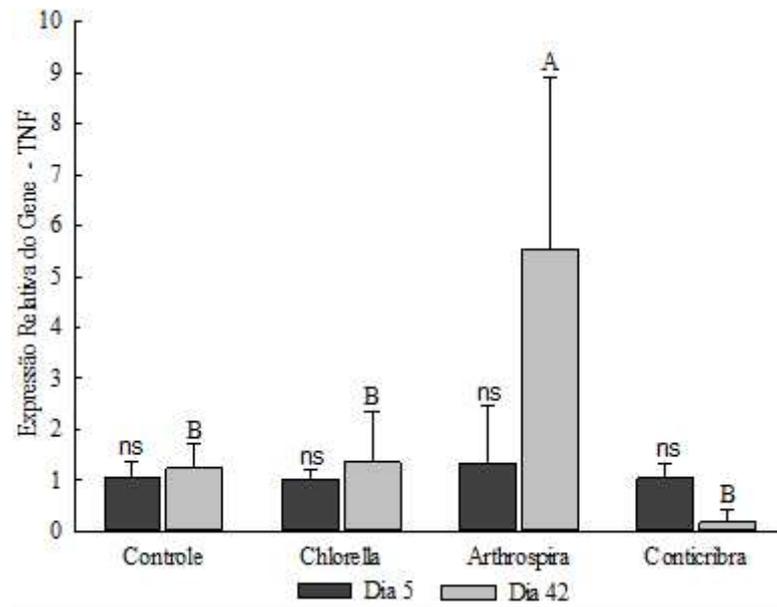
De modo geral, as microalgas fornecidas na alimentação na forma de biomassa seca ou extratos para animais aquáticos cultivados são efetivos para estimular os parâmetros de desempenho zootécnico e as funções imunológicas de numerosas espécies de animais aquáticos (Srivastava; Pandey, 2015; Pakravan *et al.*, 2018; Hassaan *et al.*, 2021).

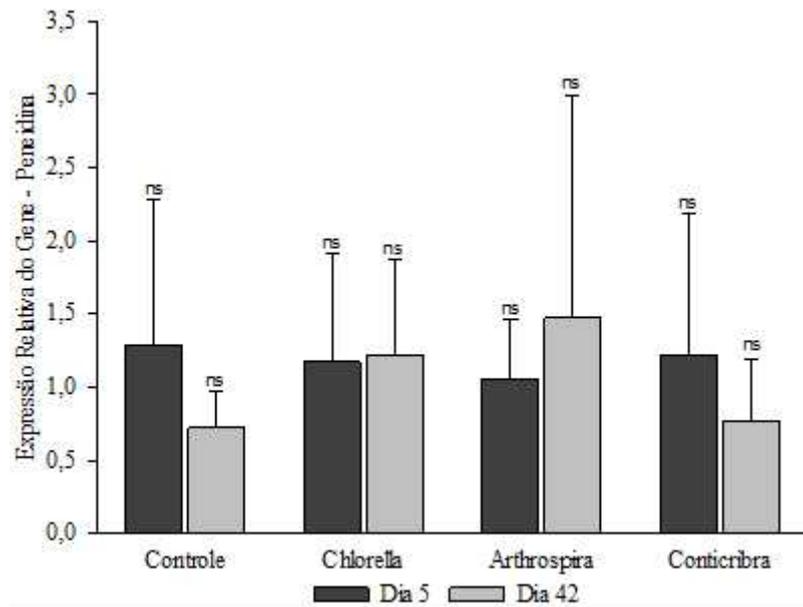
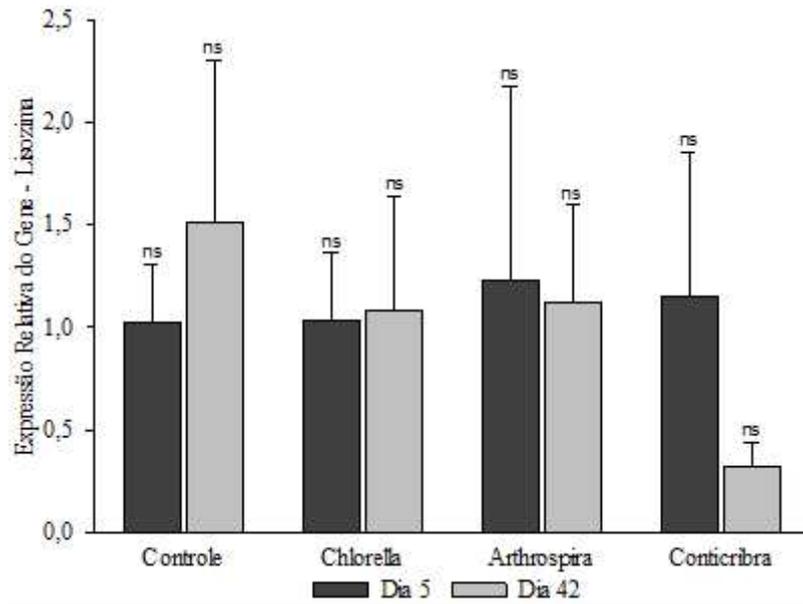
6.3 Expressão relativa dos genes imunológicos

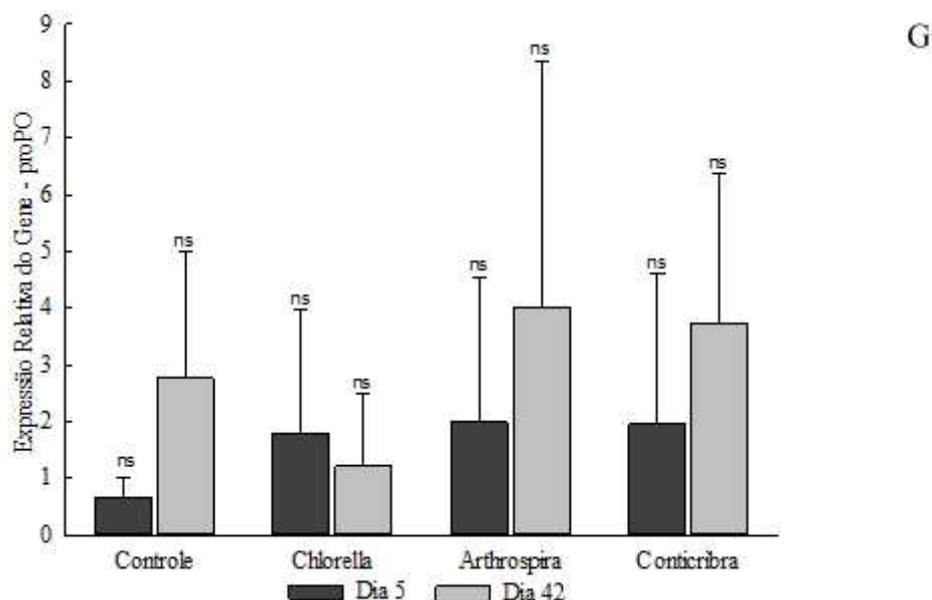
O Gráfico 5 mostra que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão relativa dos genes TGF (5,34x) e TNF (5,54x) em relação aos genes normalizadores para os camarões alimentados com a dieta suplementada com a *A. platensis* (Arthrospira) no dia 42. Todos os resultados de expressão do dia 5 e os demais resultados do dia 42 não apresentaram diferença significativamente estatística ($p < 0,05$).

Gráfico 5 - Painel de expressão relativa de 7 genes do hepatopâncreas de camarões após 5 e 42 dias de alimentação com as diferentes dietas experimentais.









Fonte: Autor.

Os camarões, assim como outros invertebrados, dependem do seu sistema imune inato contra os organismos patogênicos (Wang *et al.*, 2014). O sistema de ativação da proPO (pró-fenoloxidase) desempenha um papel importante no sistema de reconhecimento do não-próprio e participa das respostas imunes-inatas, acompanhando as respostas celulares através da atração de hemócitos e da indução da fagocitose e das reações de encapsulação (Cerenius, Lee; Söderhäll, 2008), melanogênese e reações citotóxicas associadas (NAPPI; Christensen, 2005). A expressão da proPO eleva a atividade molecular de adesão celular, opsonização e degranulação nos camarões (Chiu *et al.*, 2007). Além disso, a proPO é uma enzima sintetizadora de melanina, que é uma proteína imune importante (Li; Xiang, 2013).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) são um grupo diverso de moléculas imuno-efetoras inatas que são utilizadas pelos organismos multicelulares para combater ou prevenir infecções microbianas (Cuthbertson *et al.*, 2008). Em camarões peneídeos, foram identificadas e caracterizadas várias famílias de AMPs em seus hemócitos, incluindo as peneidinas (Destoumieux *et al.*, 1997), crustinas (Gross *et al.*, 2001; Bartlett *et al.*, 2002) e a lisozima (Xiao *et al.*, 2021).

A crustina é um grupo de PAM catiónico que são amplamente difundidos entre os crustáceos (Smith, 2011; Liu *et al.*, 2022) e apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Donpuksa *et al.*, 2024).

Em camarões, a peneidina resulta na opsonização de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus (BROWN; HANCOCK, 2006). Como membro do grupo dos

PAMs, a maioria das peneidinas apresenta significativa atividade antimicrobiana (Tassanakajon, 2011), contudo os seus mecanismos antimicrobianos ainda são desconhecidos (Xiao *et al.*, 2021).

A lisozima é a principal enzima com função imunoefetora produzida pelo hepatopâncreas e representa cerca de 4% das proteínas totais dos hemócitos dos camarões (Sotelo-Mundo *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2022).

No presente trabalho, o órgão escolhido para as análises de expressão gênica foi o hepatopâncreas, pois este desempenha um papel importante na síntese e estocagem de várias moléculas imunológicas, além de participar de muitas vias metabólicas importantes dos crustáceos (Vogt, 2020). Vários estudos com diversas espécies de crustáceos utilizam o hepatopâncreas como órgão preferencial para a avaliação de expressão gênica em experimentos imunológicos e fisiológicos (Baliarsingh *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2022).

Os resultados obtidos (Gráfico 5) mostram que o estímulo da suplementação somente afetou significativamente a expressão de dois genes, TGF e TNF, os quais foram expressos em altos níveis somente nos camarões alimentados com a *A. platensis* após 42 dias de cultivo.

O fator de necrose tumoral (TNF) foi inicialmente identificada em 1975 como uma glicoproteína induzida por endotoxina que causa a necrose de tumores e foi posteriormente identificada como um regulador chave na resposta inflamatória (Carswell *et al.*, 1975). Os TNFs são potentes citocinas inflamatórias que agem na inflamação, apoptose, proliferação celular e na estimulação de vários aspectos da imunidade na profilaxia contra patógenos (Mekata *et al.*, 2010; Wang; Shen, 2024). Eles também atuam como moléculas efetoras nos mecanismos de defesa do hospedeiro através da regulação da morte e sobrevivência da célula (Locksley; Killeen; Lenardo, 2001). As vias de morte e sobrevivência celular são ativadas pela superfamília do TNF servindo como uma poderosa barreira contra vírus invasores (Mekata *et al.*, 2010).

Os genes da superfamília ligantes do TNF apresentaram perfis de expressão gênica contra vírus (Tafalla; Coll; Secombes, 2005), bactérias (Choolert *et al.*, 2023), infecções por parasitas (Sigh; Lindenstrøm; Buchmann, 2004) e estimulação por LPS (Wang; Shen, 2024) em peixes moluscos e crustáceos.

Os resultados de expressão gênica indicam que houve uma regulação positiva do gene do TNF, o qual participa na defesa do organismo contra patógenos invasores externos,

elevando o estado de imunocompetência dos animais. A resposta de expressão do TNF ocorre principalmente nos locais imuno-ativos como o hepatopâncreas (Wang; Shen, 2024).

O Fator de crescimento transformador (TGF- β) desempenha um papel crucial na regulação do colágeno nos mamíferos e pesquisas em camundongos demonstraram que a TGF- β pode aumentar significativamente a síntese de *colla1*, um tipo de colágeno que apresenta duas cadeias *a1* (Liao *et al.*, 1995). Yu *et al.* (2019) relataram que o TGF- β e o *colla1* foram positiva e simultaneamente regulados na carpa capim. De modo semelhante ao presente estudo, SHI *et al.* (2024) revelaram que houve uma regulação positiva da expressão do gene TGF- β com a suplementação da alimentação com hidroxiprolina em camarões *P. vannamei*.

Wang *et al.*, 2019 observaram que a inclusão de silimarina na dieta resultou em um aumento no nível de citocinas antiinflamatórias (como a TGF- β) ao mesmo tempo que reduziu o nível de citocinas pró-inflamatórias (como TNF).

Já o presente trabalho evidenciou o aumento significativo na expressão da TGF- β por conta da ação imunomoduladora de componentes da *A. platensis*, e da TNF possivelmente devido a infecção por IMNV que todos os tratamentos apresentaram (dados não mostrados), o que evidencia que houve uma melhora da resposta imunológica frente as infecções acometidas aos animais alimentados com a microalga *A. platensis* após 42 dias de cultivo.

A condição de cultivo dos animais no presente estudo pode ser um fator potencialmente modulador da expressão gênica, caracterizando-se como um possível gatilho ambiental de expressão gênica (Le moullac; Haffner, 2000; Rajeev *et al.*, 2021). Diversas rotas fisiológicas podem ser influenciadas pelos sistemas de confinamento dos camarões, tais como bioflocos, águas claras e águas verdes (Pilotto *et al.*, 2019), além da alimentação ofertada (Cabrera-Stevens *et al.*, 2022) e dos parâmetros de qualidade de água, entre os quais podemos ressaltar a salinidade, a temperatura e o pH (Farhadi *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022).

Chen *et al.* (2024) exploraram o uso da *C. vulgaris* na alimentação do *P. vannamei* sob diferentes condições de salinidade. Os autores relataram que esta microalga fornecida na dieta foi capaz de melhorar a taxa de sobrevivência, a resposta imunológica, a resistência a doenças e a digestão dos camarões, impactando positivamente a microbiota intestinal e a expressão gênica e aumentando a adaptabilidade dos animais as mudanças de salinidade.

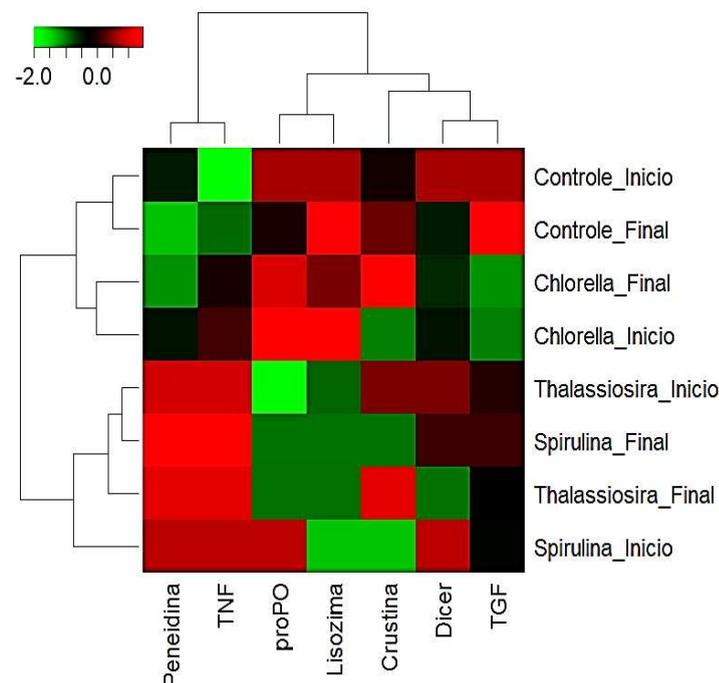
Pooljun *et al.* (2022) alimentaram camarões *Penaeus merguensis* com dietas suplementadas com β -glucanos das microalgas marinhas *Chaetoceros muelleri* e *C.*

weissflogii durante 14 dias. Os autores observaram que houve um aumento significativo da contagem de células totais, da atividade da fenoloxidase e da expressão dos genes imunológicos fatores-antilipopolissacarídeos e crustinas antes e depois do desafio com o *Vibrio parahaemolyticus*. A expressão dos genes peneidina 3 e peroxiredoxina dos animais alimentados com os β -glucanos foram significativamente maiores somente após a infecção bacteriana.

Contudo, embora uma melhora nos parâmetros zootécnicos também tenha sido evidenciado no presente trabalho, a suplementação da ração com as microalgas *C. vulgaris* e *C. weissflogii* não resultou em uma alteração significativa na expressão dos genes imunológicos analisados.

A Figura 9 apresenta o mapa de calor da expressão dos 7 genes analisados, mostrando quais genes são mais ou menos expressos entre os grupos testados.

Figura 9 - Mapa de calor da expressão relativa de 7 genes do hepatopâncreas de camarões após 5 e 42 dias de alimentação com as diferentes dietas experimentais.



Fonte: Autor.

A análise de clado revela que a expressão relativa dos genes apresentam uma divisão em dois grupos baseados no perfil de expressão gênica: Controle e Chlorella; Arthrospira e Conticribra.

Dessa forma, vemos que o grupo Chlorella apresenta um perfil de expressão gênica mais semelhante ao apresentado pelo grupo Controle.

Os grupos Arthrospira e Conticribra apresentaram uma expressão mais intensa dos genes peneidina, TNF e Dicer. O perfil de expressão gênica diferenciado desses dois grupos junto com o resultado de sobrevivência, FCA e produtividade final mostram que esse perfil de expressão gênica é diferente da apresentada pelo grupo Controle e também apresenta resultados superiores no desempenho zootécnico, tornando a inclusão dessas duas microalgas na dieta preferíveis.

7 CONCLUSÃO

A suplementação das dietas experimentais com as microalgas *A. platensis*, *C. vulgaris* e *C. weissflogii* apresentou um notável impacto positivo sobre a taxa de sobrevivência, a produtividade final e o FCR. Contudo, não foi verificado uma melhora significativa nos parâmetros peso corporal final e consumo de ração aparente.

O estímulo da suplementação somente afetou significativamente a expressão de dois genes, TGF e TNF, os quais foram expressos em altos níveis somente nos camarões alimentados com a *A. platensis* após 42 dias de cultivo. O que evidenciou uma melhora na imunocompetência dos animais.

Levando-se em consideração que (1) não houve diferença estatisticamente significativa no desempenho zootécnico das três microalgas utilizadas, (2) houve uma regulação positiva da TGF e TNF no tratamento final da *Artrhospira*, além de apresentar um perfil de expressão gênica positiva diferenciado no *heat map* e (3) devido a maior facilidade de cultivo de forma contínua da *A. platensis* em comparação com as outras microalgas, a *A. platensis* se apresenta como melhor alternativa para suplementação na alimentação.

Novos estudos são necessários para oferecer novas perspectivas sobre a investigação dos processos moleculares que regulam o sistema imunológico, digestório e as reações metabólicas em camarões.

REFERÊNCIA

- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative biochemistry and physiology part A: Molecular & integrative physiology**, v. 138, n.4, p. 405-415, 2004.
- ADEL, M. et al. Efeitos da *Spirulina platensis* dietética no desempenho do crescimento, respostas imunes humorais e mucosas e resistência a doenças em esturjão-grande juvenil (*Huso huso* Linnaeus, 1754). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 56, p. 436-444, 2016.
- AHMAD, MT et al. Aplicações da microalga *Chlorella vulgaris* na aquicultura. **Revisões em Aquicultura**, v. 12, p. 328-346, 2020.
- ALAVI, N.; GOLMAKANI, M. -T. Antioxidant properties of whole-cell *Spirulina (Arthrospira platensis)* powder expressed in olive oil under accelerated storage conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 2971-2978, 2017.
- ALGAEBASE. Disponível em: <https://www.algaebase.org/>. Acesso em: 10 jun, 2023.
- ALI, M. S. *et al.* GCMS analysis and invitro antibacterial and anti-inflammatory study on methanolic extract of *Thalassiosira weissflogii*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101148, 2019.
- ALVES, L.G. **Polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha *Sargassum vulgare***. 2000. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Bioquímica). Departamento de Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2000.
- AMARO, H. M.; MACEDO, Â. C.; MALCATA, F. X. Microalgae: an alternative as sustainable source of biofuels? **Energy**, v. 44, n. 1, p. 158-166, aug. 2012.
- ANAND, PSS *et al.* Efeito da suplementação dietética de perifiton no desempenho do crescimento e nas atividades das enzimas digestivas em *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 392, p. 59-68, 2013.
- ANDERSEN, HJ *et al.* Alimentação e qualidade da carne – uma abordagem futura. **Meat Science**, v. 70, n. 3, p. 543-554, 2005.
- ANIRUDHAN, A. *et al.* Pandanus tectorius fruit extract promotes Hsp70 accumulation, immune-related genes expression and *Vibrio parahaemolyticus* tolerance in the white-leg shrimp *Penaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 109, p. 97-105, 2021.
- ARAYAMETHAKORN, S. *et al.* Comparative effects of different bacterial lipopolysaccharides on modulation of immune levels to improve survival of the black tiger shrimp. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 197, p. 107872, 2023.
- ARMBRUST, E. V. *et al.* The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. **Science**, v. 306, n. 5693, p. 79-86, 2004.
- ARMSTRONG, P. B. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in hostpathogen interaction. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 263-281, 2006.

ASHOUR, M. *et al.* Ammonia bioremediation from aquaculture wastewater effluents using *Arthrospira platensis* NIOF17/003: Impact of biodiesel residue and potential of ammonia-loaded biomass as rotifer feed. **Materials**, v. 14, n. 18, p. 5460, 2021.

ASHOUR, M. *et al.* Effect of dietary seaweed extract supplementation on growth, feed utilization, hematological indices, and non-specific immunity of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 3467-3479, 2020.

BACHÈRE, E. *et al.* Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 149-168, Apr. 2004.

BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, v.191, p. 3-11, 2000.

BACHÈRE, E.; MIAHLE, E.; RODRIGUES, J. Identificação de efetores de defesa na hemolinfa de crustáceos com referência particular ao camarão *Penaeus japonicus* (Bate), perspectivas e aplicações. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 5, p. 597-612, 1995.

BADWY, T. M.; IBRAHIM, E. M.; ZEINHOM, M. M. **Partial replacement of fish meal with dried microalga (*Chlorella spp.* and *Scenedesmus spp.*)**. 2008. Disponível em: <https://cales.arizona.edu/azaqua/ista/ISTA8/FinalPapers/11%20Nutrition/PDF/8.%20TARTIE L.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2023.

BALIARSINGH, S.; DASH, M.; DEWANGAN, N.; HAMEED, A. S. S.; MOHANTY, J.; LEE, Y. S.; PATNAIK, B. B. Upregulation of hepatopancreas associated lectin transcripts in *Macrobrachium rosenbergii* in response to *Vibrio harveyi* and *M. rosenbergii* nodavirus (MrNV). **Journal of Environmental Biology**, [S. l.], v. 40, p. 969–976, 2019.

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances em la Inmunología del Camarón. In: VIELKA, M. Q.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.). **Guía Técnica de Patología y Inmunología de Camarones Penaeidos**, ED. CYTED, p.237-288, 2014.

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Inmunología del camarón. **Guía técnica-patología e inmunología de camarones penaeidos: Programa CYTED Red II-D Vannamei**. Panamá: [s.n.], 2008.

BARTLETT, TC *et al.* Crustins, homólogos de um peptídeo antibacteriano de 11,5 kDa, de duas espécies de camarão peneídeo, *Litopenaeus vannamei* e *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 278-293, 2002.

BATISTA, A. P.; NICCOLAI, A.; FRADINHO, P.; FRAGOSO, S.; BURSIC, I.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A. Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and *in vitro* digestibility. **Algal Research**, v. 26, p. 161-171, 2017.

BELAY, A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 28-48, 2002.

BENGWAYAN, P. T. *et al.* A comparative study on the antioxidant property of *Chlorella (Chlorella sp.)* tablet and glutathione tablet. **E-International Scientific Research Journal**, ISSN: 2094-1749, v. 2, n. 1, p. 25-35, 2010.

BEZERRA, A.M.; SILVA, J.A.A. da; MENDES, P. de P. Seleção de variáveis em modelos matemáticos dos parâmetros de cultivo do camarão marinho *Penaeus vannamei*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.385-391, 2007.

BITO, T. *et al.* Potential of *Chlorella* as a dietary supplement to promote human health. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2524, 2020.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 5, p. 64-76, 2000.

BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A. BORGHETTI, J.R. **Aquicultura**: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, 2003. 129 p.

BROWN, KL; HANCOCK, REW Peptídeos catiônicos de defesa do hospedeiro (antimicrobianos). **Current Opinion in Immunology** , v. 18, n. 1, p. 24-30, 2006.

BULET P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 169-184, 2004.

CABRERA-STEVENSON, M. J.; SÁNCHEZ-PAZ, A.; MENDOZA-CANO, F.; ESCOBEDO-FREGOSO, C.; ENCINAS-GARCÍA, T.; ELIZONDO-GONZÁLEZ, R.; PEÑA-RODRÍGUEZ, A. Transcriptome analysis reveals differential gene expression associated with white spot syndrome virus resistance in the shrimp *Litopenaeus vannamei* fed on functional diets. **Aquaculture**, [S. l.], v. 547, 737434, 2022.

CAMPA-CÓRDOVA, A. I. *et al.* Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide **Fish and Shellfish Immunology**. v. 12, n. 4, p.353–366, 2002.

CANTELLI, L. **Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria birdie* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)**. 2009. Dissertação (Pós-graduação em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

CARSWELL, E. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1975, 72.9: 3666-3670.

CERENIUS, L.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in immunology**, 2008, 29.6: 263-271.

CHEN, H. W.; YANG, T. S.; CHEN, M. J.; CHANG, Y. C., CHEN WANG, E. I.; HO, C. L.; LAI, Y. J.; YU, C. C.; CHOU, J. C.; CHAO, L. K. P.; LIAO, P. C. Purification and immunomodulating activity of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1337-1344, Aug 2014.

CHEN, J. *et al.* Aproveitando o potencial de *Chlorella vulgaris* para crescimento, imunidade, digestão, microbiota e imunometabolismo aprimorados em *Litopenaeus vannamei* se alimentando em salinidades variadas. **Aquaculture** , v. 581, p. 740469, 2024.

CHEN, M. *et al.* Enhanced intestinal health, immune responses and ammonia resistance in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed dietary hydrolyzed yeast (*Rhodotorula mucilaginosa*) and *Bacillus licheniformis*. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100385, 2020.

CHEN, Y. -X *et al.* Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 505-509, 2016.

CHEN, Y. Y.; CHEN, J. C.; TAYAG, C. M.; LI, H. F.; PUTRA, D. F.; KUO, Y. H.; BAI, J. C.; CHANG, Y. H. *Spirulina elicits* the activation of innate immunity and increases resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 55, p. 690-698, 2016.

CHIU, C. H. *et al.* Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & shellfish immunology**, 2007, 23.2: 364-377.

CHIU, S. Y.; KAO, C. Y.; CHEN, T. Y.; CHANG, Y. B.; KUO, C. M.; LIN, C. S. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 184, p. 179-189, May 2015.

CHOOBERT, C. *et al.* A novel tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) gene from *Macrobrachium rosenbergii* involved in antibacterial defense against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, 2023, 140: 108945.

CUTHBERTSON, B. J. *et al.* Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. **Developmental & Comparative Immunology**, 2008, 32.3: 167-181.

DA SILVEIRA, L. G. P. *et al.* Hyperintensive stocking densities for *Litopenaeus vannamei* grow-out in biofloc technology culture system. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 51, n. 6, p. 1290-1300, 2020.

DESTOUMIEUX, D. *et al.* Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **Journal of Biological Chemistry**, 1997, 272.45: 28398-28406.

DIETRICH, C.P. *et al.* A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**, v.108, p.143-153, 1995.

DONPUDSA, S. *et al.* Caracterização de uma nova Crustina Tipo-I (*carcininaPm2*) do camarão tigre preto *Penaeus monodon* . **Fish & Shellfish Immunology** , v. 148, p. 109520, 2024.

EMERENCIANO, M. GC *et al.* Intensification of penaeid shrimp culture: an applied review of advances in production systems, nutrition and breeding. **Animals**, v. 12, n. 3, p. 236, 2022.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of the World Fisheries and Aquaculture 2022**. Sustainability in action. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 266, 2022.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of the World Fisheries and Aquaculture 2024**. Sustainability in action. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 264, 2024.

FAR, H. Z. *et al.* Effect of *Bacillus subtilis* on the growth and survival rate of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **African Journal of Biotechnology**, 2009, 8.14.

FARHADI, A.; TANG, S.; HUANG, M.; YU, Q.; XU, C.; LI, E. Identification of key immune and stress related genes and pathways by comparative analysis of the gene expression profile under multiple environmental stressors in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 135, p. 108695, 2023.

FARIAS, W.R.L. *et al.* Enhancement of growth in tilapia larvae (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from the red marine alga *Botryocladia occidentalis*. **Revista Ciência Agronômica**. Fortaleza, CE. v. 35, Número Especial, p. 189–195, 2004.

FINAMORE, A. *et al.* Antioxidant, immunomodulating, and microbial-modulating activities of the sustainable and ecofriendly spirulina. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2017.

FLEGEL, T. W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of invertebrate pathology**, v. 110, n. 2, p. 166-173, 2012.

FLEGEL, T. W., Lightner, D. V., Owens, L. Shrimp disease control: past, present and future. Diseases in Asian aquaculture VI. Fish Health Section. **Asian Fisheries Society**, Manila, Philippines, p. 355–378, 2008.

GAO, J. *et al.* Long-term influence of cyanobacterial bloom on the immune system of *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 61, p. 79-85, 2017.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; ROBLES-MEDINA, A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, Jan 2003.

GROSS, P. S. *et al.* Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of haemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White shrimp, *L. setiferus*. **Developmental & Comparative Immunology**, v.25, p.565-577, 2001.

GUERREIRO, I. *et al.* Effect of temperature and dietary protein/lipid ratio on growth performance and nutriente utilization of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Aquaculture Nutrition**, v.18, n.1, p. 126-133, Goiás, 2014.

GUNALAN, B. S. N. T. *et al.* Nutritive value of cultu red white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **International Journal of Fisheries and Aquaculture**, v. 5, n. 7, p. 166-171, 2013.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709-732, May-June 2012.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, Apr 2010.

HASSAAN, M. S. *et al.* Comparative study on the effect of dietary β -carotene and phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* on immune-oxidative stress biomarkers, genes expression and intestinal enzymes, serum biochemical in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 108, p. 63-72, 2021.

HENRARD, A. A. *et al.* Effect of the carbon concentration, blend concentration, and renewal rate in the growth kinetic of *Chlorella* sp. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. Activation of the human innate immune system by *Arthrospira*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Arthrospira plantensis*. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 423-434, 2002.

HOSEINI, S. M.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MOZAFARI, M. R. Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1231-1237, 2013.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 128-150, 2005.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal 2022**. Rio de Janeiro, ISSN: 0101423, 2023.

ANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, California, v. 20, p. 197-216, 2002.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, p. 213-236, 2006.

KESSLER, E.; HUSS, V. Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the Culture Collection of the University of Texas at Austin. **Journal of Phycology**, v. 28, n. 4, p. 550-553, 1992.

KHAFAGA, A. F.; EL-SAYED, Y. S. *Spirulina* ameliorates methotrexate hepatotoxicity via antioxidant, immune stimulation, and proinflammatory cytokines and apoptotic proteins modulation. **Life sciences**, v. 196, p. 9-17, 2018.

KIATMETHA, P. *et al.* Enhancement of survival and metamorphosis rates of *Penaeus monodon* larvae by feeding with the diatom *Thalassiosira weissflogii*. **Aquaculture International**, v. 19, p. 599-609, 2011.

KIRON, V. *et al.* Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 521-531, 2012.

KO, S. -C.; KIM, D.; JEON, Y. -J. Protective effect of a novel antioxidative peptide purified from a marine *Chlorella ellipsoidea* protein against free radical-induced oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2294-2302, 2012.

KORU, E. Earth food *Spirulina* (*Arthrospira*): production and quality standards. **Food additive**, v. 76, n. 4, p. 46-67, 2012.

KOTRBÁČEK, V.; DOUBEK, J.; DOUCHA, J. The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 6, p. 2173-2180, 2015.

LARAMORE, S.; LARAMORE, CR; SCARPA, J. Efeito da baixa salinidade no crescimento e sobrevivência de pós-larvas e juvenis de *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 32, n. 4, p. 385-392, 2001.

LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, [S. l.], v. 191, n. 1-3, p. 121-131, 2000.

LEE, D. *et al.* Viral shrimp diseases listed by the OIE: a review. **Viruses**, v. 14, n. 3, p. 585, 2022.

LEE, I.; HAN, J. I. Simultaneous treatment (cell disruption and lipid extraction) of wet microalgae using hydrodynamic cavitation for enhancing the lipid yield. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 186, p. 246-251, 2015.

LI, F.; XIANG, J. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 39, n. 1-2, p. 11-26, 2013.

LI, H. -B. *et al.* Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 771-776, 2007.

LIANG, Z. *et al.* A low-density lipoprotein receptor (LDLR) class A domain-containing C-type lectin from *Litopenaeus vannamei* plays opposite roles in antibacterial and antiviral responses. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 92, p. 29-34, 2019.

LIAO, Q.; LI, L.; CHEN, R.; ZHU, X. A novel photobioreactor generating the light/dark cycle to improve microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 186-191, 2014.

LIAO, Z. *et al.* Expression of CTGF mRNA in sclerotic skin of mice with bleomycin-induced scleroderma. **Chinese Journal of Dermatology**, 1995.

LIN, Y. C. *et al.* White shrimp *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 6, p. 1092-1098, 2010.

LIU, H.; SÖDERHÄLL, K.; JIRAVANICHPAISAL, P. Antiviral immunity in crustaceans. **Fish and Shellfish Immunology**, v.27, p.79-88, 2009.

LIU, L. *et al.* Effects of *Lactobacillus pentosus* combined with *Arthrospira platensis* on the growth performance, immune response, and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 120, p. 345-352, 2022.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487-501, 2001.

LUO, K. *et al.* Evaluation of paraprobiotic applicability of *Clostridium butyricum* CBG01 in improving the growth performance, immune responses and disease resistance in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 544, p. 737041, 2021.

LUPATSCH, I.; BLAKE, C. Algae alternative: *Chlorella* studied as protein source in tilapia feeds. **Global Aquaculture Advocate**, v. 16, p. 78-79, 2013.

- MAEDA, Y.; YOSHINO, T.; MATSUNAGA, T.; MATSUMOTO, M.; TANAKA, T. Marine microalgae for production of biofuels and chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 111-120, apr 2018.
- MAGOUZ, F. I. *et al.* Population dynamics, fecundity and fatty acid composition of *Oithona nana* (Cyclopoida, Copepoda), fed on different diets. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1188, 2021.
- MALIWAT, G. C. *et al.* Growth and immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) postlarvae fed diets containing *Chlorella vulgaris* (Beijerinck). **Aquaculture Research**, v. 48, n. 4, p. 1666-1676, 2017.
- MANSOUR, A. T. *et al.* The evaluation of *Arthrospira platensis* bioactivity and their dietary supplementation to Nile tilapia vegetarian diet on growth performance, feed utilization, body composition and hemato-biochemical parameters. **Annals of Animal Science**, v. 21, n. 3, p. 1061-1080, 2021.
- MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (bluegreen algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3389-3401, 2011.
- MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G. Mass cultivation of freshwater microalgae. In: **Encyclopedia of Ecology**. p. 2226-2235. DOI 10.1016/B978-008045405-4.00830-2, 2014.
- MEKATA, T. *et al.* A novel gene of tumor necrosis factor ligand superfamily from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 4, p. 571-578, 2010.
- MOBIN, S.; ALAM, F. Some promising microalgal species for commercial applications: A review. **Energy Procedia**, v. 110, p. 510-517, 2017.
- MOHAN, S. V.; ROHIT, M. V.; CHIRANJEEVI, P.; CHANDRA, R.; NAVANEETH, B. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 184, p. 169-178, May 2015.
- MUÑOZ, M. *et al.* Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 11, p. 2678-2689, 2002.
- NAPPI, A. J.; CHRISTENSEN, B. M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 443-459, 2005.
- NAPPI, A. J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioessays**, v. 22, n. 5, p. 469-480, 2000.
- NUNES, A. J. P. O cultivo do camarão *Penaeus vannamei* em águas oligohalinas. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 11, p. 37-51, 2001.
- PAKRAVAN, S. *et al.* *Chlorella vulgaris* meal improved growth performance, digestive enzyme activities, fatty acid composition and tolerance of hypoxia and ammonia stress in

juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 594-604, 2018.

PENG, K. *et al.* Inclusion of *Chlorella* water extract in *Oreochromis niloticus* fingerling diets: Effects on growth performance, body composition, digestive enzyme activity, antioxidant and immune capacity, intestine and hepatic histomorphology and sodium nitrite stress resistance. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 100547, 2020.

PILOTTO, M. R. *et al.* Potential immunomodulatory and protective effects of the *Arthrospira*-based dietary supplement on shrimp intestinal immune defenses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 88, p. 47-52, 2019.

PLAZA, M.; SANTOYO, S.; JAIME, L.; GARCÍA-BLAIRSY, R. G.; HERRERO, M.; SEÑORÁNS, F. J.; IBÁÑEZ, E. Screening for bioactive compounds from algae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 450-455, Jan. 2010.

POOLJUN, C. *et al.* Effect of feeding different types of β -glucans derived from two marine diatoms (*Chaetoceros muelleri* and *Thalassiosira weissflogii*) on growth performance and immunity of banana shrimp (*Penaeus merguensis*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 130, p. 512-519, 2022.

RAJEEV, R.; ADITHYA, K. K.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J. Healthy microbiome: a key to successful and sustainable shrimp aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 238–258, 2021.

REDDY, K. V.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 24, n. 6, p. 536-547, 2004.

REITAN, K. I.; RAINUZZO, J. R. Nutritional effects of algal addition in first-feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. **Aquaculture**, v. 118, n. 3-4, p. 257-275, 1993.

RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of microalgal culture: applied Phycology and Biotechnology**. John Wiley & Sons, 2013.

ROCHA, H. A. O.; FARIAS, E. H. C.; BEZERRA, L. C. L. M.; ALBUQUERQUE, I. R. L.; MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; LEITE, E. L. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. **Infarma**, v. 16, n. 1, p. 82-87, 2004.

SAMBROOK, J. Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from eukaryotic cells. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, p. 7.3-7.79, 1987.

SHARAWY, Z. Z. *et al.* Effects of dietary *Arthrospira platensis* nanoparticles on growth performance, feed utilization, and growth-related gene expression of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 551, p. 737905, 2022.

SHI, M. *et al.* Effects of hydroxyproline supplementation in low fish meal diets on collagen synthesis, myofiber development and muscular texture of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Animal Nutrition**, 2024.

SHI, X. *et al.* Effect of fish meal replacement by *Chlorella* meal with dietary cellulase addition on growth performance, digestive enzymatic activities, histology and myogenic

genes' expression for crucian carp (*Carassius auratus*). **Aquaculture Research**, v. 48, n. 6, p. 3244-3256, 2017.

SHIN, Y. S.; CHOI, H. I.; CHOI, J. W.; LEE, J. S.; SUNG, Y. J.; SIM, S. J. Multilateral approach on enhancing economic viability of lipid production from microalgae: A review. **Bioresource Technology**, v. 258, p. 335-344, 2018.

SIGH, J.; LINDENSTRØM, T.; BUCHMANN, K. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 17, n. 1, p. 75-86, 2004.

SILVA, J. W. A. Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em efluentes aquícolas e sua influência na concentração lipídica. 2013. 48 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SMITH, V. J. Phylogeny of whey acidic protein (WAP) four-disulfide core proteins and their role in lower vertebrates and invertebrates. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1403-1408, 2011.

SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, p. 71-90, 2003.

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. Spirulina – From growth to nutritional product: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 157-171, 2017.

SOTELO-MUNDO, R. R. *et al.* cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, n. 4, p. 325-331, 2003.

SRIVASTAVA, P. K.; PANDEY, A. K. Role of immunostimulants in immune responses of fish and shellfish. **Biochem Cell Arch**, v. 15, n. 1, p. 47-73, 2015.

STACHURA-SUCHOPLES, K.; WILLIAMS, D. M. Description of *Conticribra tricircularis*, a new genus and species of Thalassiosirales, with a discussion on its relationship to other continuous cribra species of *Thalassiosira* Cleve (Bacillariophyta) and its freshwater origin. **European Journal of Phycology**, v. 44, n. 4, p. 477-486, 2009.

TABARSA, M. *et al.* An immune-enhancing water-soluble α -glucan from *Chlorella vulgaris* and structural characteristics. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 1933-1941, 2015.

TAFALLA, C.; COLL, J.; SECOMBES, C. J. Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 29, n. 7, p. 615-626, 2005.

TALPUR, A. D.; IKHWANUDDIN, M.; AMBOK-BOLONG, A. M. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale*) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer*, and disease resistance against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, n. 400, p. 46-52, 2015.

TAM, L. T. *et al.* Cultivation and biomass production of the diatom *Thalassiosira weissflogii* as a live feed for white-leg shrimp in hatcheries and commercial farms in Vietnam. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, p. 1559-1577, 2021.

- TANG, Y. *et al.* Effects of live microalgae and algae powder on microbial community, survival, metamorphosis and digestive enzyme activity of *Penaeus monodon* larvae at different growth stages. **Aquaculture**, v. 526, p. 735344, 2020.
- TASSANAKAJON, A. *et al.* Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp. **Marine Biotechnology**, v. 13, p. 639-657, 2011.
- TASSANAKAJON, A. *et al.* Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 954-967, 2013.
- TAYAG, C. M.; LIN, Y. C.; LI, C. C.; LIOU, C. H.; CHEN, J. C. Administration of the hot-water extract of *Arthrospira platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, p. 764-773, 2010.
- TEIMOURI, M.; AMIRKOLAIE, A. K.; YEGANEH, S. The effects of *Arthrospira platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 396-399, n. 1, p. 14-19, 2013.
- THITAMADEE, S. *et al.* Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. **Aquaculture**, v. 452, p. 69-87, 2016.
- TIBALDI, E. *et al.* Growth performance and quality traits of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp. (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. **Aquaculture**, v. 440, p. 60-68, 2015.
- TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v. 80, n. 6, p. 717-735, 2005.
- TRANG, T. T. *et al.* Genetic variation in disease resistance against White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei*. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 264, 2019.
- TULLI, F. *et al.* Effect of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 21, n. 3, p. 188-197, 2012.
- VARGAS-ALBORES, F. Herramientas para determinar inmunoestimulación. In: **MEMORIALS DEL SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN AQUICOLA**, 6., Cancun. Anais... Cancun: [s.n.], p. 48-52, 2002.
- WAN, D.; WU, Q.; KUČA, K. *Spirulina*. In: Nutraceuticals, p. 569-583, 2016.
- WANG, J. *et al.* Effects of silymarin on growth performance, antioxidant capacity and immune response in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 6, p. 1168-1181, 2019.
- WANG, K. H. *et al.* RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (*LvToll*) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 1, p. 49-58, 2010.

- WANG, K.; SHEN, H. Identification of tumor necrosis factor receptor 1 and its association with LPS-induced apoptosis in *Onchidium reevesii*. **Aquaculture and Fisheries**, 2024.
- WANG, P. H. *et al.* Antiviral defense in shrimp: from innate immunity to viral infection. **Antiviral Research**, v. 108, p. 129-141, 2014.
- WANG, P. *et al.* Hypoxia stress affects the physiological responses, apoptosis and innate immunity of Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 122, p. 206-214, 2022.
- WANG, X. W.; WANG, J. X. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 39, p. 27-38, 2013.
- WANG, X.; ZHANG, X. Separation, antitumor activities, and encapsulation of polypeptide from *Chlorella pyrenoidosa*. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 3, p. 681-687, 2013.
- WATANUKI, H. *et al.* Immunostimulant effects of dietary *Arthrospira platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 258, n. 1, p. 157-163, 2006.
- XIAO, B. *et al.* BigPEN, an antimicrobial peptide of penaeidin family from shrimp *Litopenaeus vannamei* with membrane permeable and DNA binding activity. **Fish and Shellfish Immunology Reports**, v. 2, p. 100034, 2021.
- XING, K. *et al.* Transcriptomic analysis of *Neocaridina denticulate sinensis* hepatopancreas indicates immune changes after copper exposure. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 121, p. 23-30, 2022.
- XU, W. *et al.* Effect of dietary *Chlorella* on the growth performance and physiological parameters of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, n. 1, 2014.
- YAMAMOTO, M. *et al.* Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Journal of Plant Research**, v. 117, n. 4, p. 257-264, 2004.
- YANG, S. *et al.* Effect of sub-lethal ammonia and nitrite stress on autophagy and apoptosis in hepatopancreas of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 130, p. 72-78, 2022.
- YEGANEH, S.; TEIMOURI, M.; AMIRKOLAIE, A. K. Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Research in Veterinary Science**, v. 101, p. 84-88, 2015.
- YI, Q. *et al.* The protection of CpG ODNs and *Yarrowia lipolytica* harboring VP28 for shrimp *Litopenaeus vannamei* against White spot syndrome virus infection. **Invertebrate Survival Journal**, v. 11, n. 1, p. 119-131, 2014.
- YU, E. M. *et al.* Smad4-dependent regulation of type I collagen expression in the muscle of grass carp fed with faba bean. **Gene**, v. 685, p. 32-41, 2019.

ZAKI, M. A. *et al.* Potential Applications of native cyanobacterium isolate (*Arthrospira platensis* NIOF17/003) for biodiesel production and utilization of its byproduct in marine rotifer (*Brachionus plicatilis*) production. **Sustainability**, v. 13, n. 4, p. 1769, 2021.

ZENG, X. *et al.* Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1385-1392, fev. 2015.

ZHANG, P. *et al.* Effects of *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira pseudonana* monocultures on growth performance and nutrient composition of *Litopenaeus vannamei*. **Algal Research**, v. 66, p. 102769, 2022.

ZHANG, X. *et al.* Evaluation on prevention and treatment of cuminaldehyde in culture of shrimp against white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v. 562, p. 738760, 2023.

ZHAO, J. M.; MA, C. Y.; LIU, L. H. Temporal scaling of the growth dependent optical properties of microalgae. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, v. 214, p. 61-70, jul. 2018.

ZHENG, J. *et al.* Identification and functional characterization of a novel C-type lectin from the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 530, n. 3, p. 547–553, 2020.

ZHUANG, X. *et al.* A comparison on the preparation of hot water extracts from *Chlorella pyrenoidosa* (CPEs) and radical scavenging and macrophage activation effects of CPEs. **Food & Function**, v. 5, n. 12, p. 3252-3260, 2014.