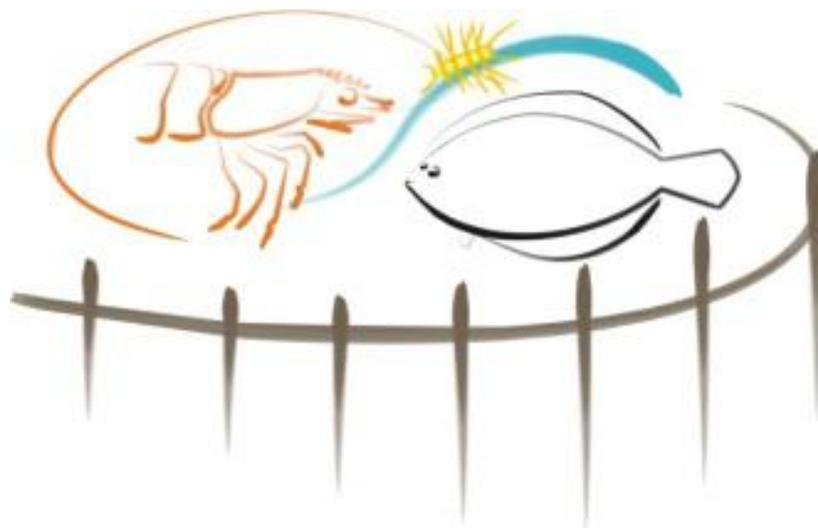


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG**  
**INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA - IO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA - PPGAq**



**INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO NA GERAÇÃO DE ESPÉCIES  
REATIVAS DE OXIGÊNIO E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO EM LARVAS DO  
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

**EDUARDA COSTA BUENO**

**RIO GRANDE - RS**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG**  
**INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA – IO**  
**PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA – PPGAq**

**INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO NA GERAÇÃO DE ESPÉCIES  
REATIVAS DE OXIGÊNIO E DESEMPENHO ZOOTÉCNICO EM LARVAS DO  
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei***

**Eduarda Costa Bueno**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande

**Orientador: Dr. José María Monserrat (ICB - FURG)**

**Coorientador: Dr. Luis Henrique da Silva Poersch. (IO- FURG)**

**RIO GRANDE - RS**

**2017**

**SUMÁRIO**

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVO GERAL.....	15
2.1 Objetivos específicos.....	15
3. METODOLOGIA GERAL.....	15
3.1 Pré-teste.....	16
3.2 Delineamento experimental.....	16
3.3 Parâmetros de qualidade de água.....	19
3.4 Cultivo e coleta das microalgas.....	19
3.5 Extração dos pigmentos, dosagem de flavonoides e polifenóis totais.....	20
3.6 Determinação de ERO <i>in vivo</i> por fluorescência.....	21
3.7 Teste de estresse de temperatura.....	23
3.8 Análise estatística.....	23
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Flavonoides e polifenóis totais nas microalgas-.....	24
4.2 Parâmetros de qualidade de água.....	26
4.3 Desempenho zootécnico.....	26
4.4 Determinação de ERO <i>in vivo</i> .....	28
5. DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

## AGRADECIMENTOS

Aos meus mestres, orientador e coorientador, Monserrat e Mineiro pela grande paciência, ensinamentos, contribuições no meu crescimento profissional e pessoal e por terem permitido que eu pudesse estar ao junto de vocês neste trabalho.

A todos do Projeto Camarão e ao professor Mano, pelo auxílio prestado durante o mestrado e pelas sábias palavras ditas (escutadas e seguidas com atenção) que me levaram mais adiante;

A pequena equipe Larvi/Fito muito bem composta pela Sabrina, Mari e Alessandro por toda a confiança depositada, por me mostrarem de forma didática cada dificuldade encontrada, pelas estocagens infinitas, pela presença diária, por me darem responsabilidades, pela forma como me apresentaram a larvicultura, pela segurança transmitida e por muito mais;

Ao Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos por ceder às cepas utilizadas neste estudo e em especial ao Fabio pela disponibilidade em ajudar sempre;

A minha família e ao Henrique, pelo amor e compreensão dedicados a mim;

As minha amigona de poucos anos, mas de muitas vidas Flavinha e sua família, a Raíza e a Roberta por me emprestarem seus ouvidos e aos amigos/colegas/companheiros conquistados ao longo do trajeto, por serem a “minha maluquez misturada com minha lucidez”;

Aos professores e colegas da EMA e do ICB e toda equipe que trabalha nesses lugares e faz com que nos sintamos em casa;

## RESUMO

As diatomáceas são amplamente utilizadas na alimentação de larvas de camarões peneídeos, destacando-se as espécies *Conticribra weissflogii* e *Chaetoceros muelleri* como as mais utilizadas, porém até o momento ainda são escassos os estudos sobre suas influências no sistema antioxidante dos organismos em cultivo. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das microalgas *C. weissflogii* e *C. muelleri* nas respostas antioxidantes e desenvolvimento das larvas de *L. vannamei*. No experimento 1 utilizou-se a microalga *C. weissflogii* ofertada para as larvas na forma *in natura* em dois tratamentos: (i) *C. weissflogii* (coletada e ofertada no 4º dia de cultivo da microalga) e (ii) controle (coletada e ofertada em dias distintos do cultivo). O tratamento em que a microalga foi coletada no 4º dia do cultivo (*C. weissflogii*) apresentou maior concentração de flavonoides totais e os animais alimentados com esse tratamento apresentaram maior sobrevivência final e maior tamanho corporal quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ). Para os parâmetros de qualidade de água, polifenóis totais, taxa de metamorfose, teste de estresse de temperatura e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) *in vivo* não houve diferenças significativas. O segundo experimento foi constituído de duas etapas (A e B) com dois tratamentos utilizando as microalgas *C. muelleri* e *C. weissflogii*, coletadas no 5º dia do cultivo e ofertadas na forma de pasta. A etapa A teve duração da fase de protozoa I a mysis I e a etapa B da fase de mysis I a pós-larva 1. Foi avaliado o conteúdo de flavonoides e polifenóis totais no 3º, 5º e 7º dia de cultivo e verificou-se que o 5º dia apresentou maiores teores de polifenóis e o 7º dia de flavonoides ( $p < 0,05$ ) nas duas espécies de microalgas. O tratamento onde foi utilizada a microalga *C. muelleri* apresentou maior sobrevivência final na etapa A, enquanto na etapa B, o tratamento usando *C. weissflogii* apresentou maior sobrevivência final e tamanho corporal das larvas ( $p < 0,05$ ). Para a concentração de ERO foi observada uma redução significativa na fase de mysis II no tratamento *C. muelleri* ( $p < 0,05$ ). Em pós-larva 1 os dois tratamentos apresentaram um elevado aumento na concentração de ERO quando comparados com as outras fases larvais ( $p < 0,05$ ). Ambas as microalgas apresentaram vantagens importantes quando ofertadas em um dia específico do cultivo, se propondo, em estudos futuros considerar a oferta de um “mix” controlado de *C. muelleri* e *C. weissflogii*.

**Palavras-chave:** *Chaetoceros muelleri*, *Conticribra weissflogii*, larvicultura, ERO, antioxidantes não enzimáticos.

## ABSTRACT

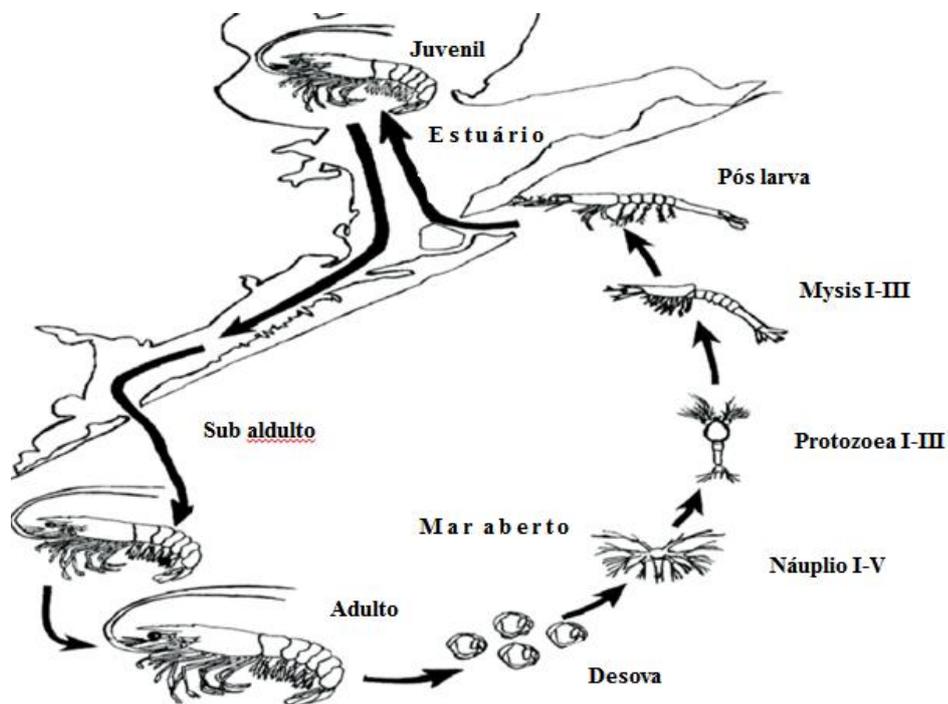
The diatoms are used to feed larvae of penaeid shrimps, with the most notable being the species *Conticribra weissflogii* and *Chaetoceros muelleri*, but to date the studies about their influence on the antioxidant system of the organisms in cultivation are still scarce. The objective of this work was to evaluate the effect of the microalgae *C. weissflogii* and *C. muelleri* on the antioxidant responses and development of *L. vannamei* larva. In the experiment 1, the microalgae *C. weissflogii* was offered to the larvae *in natura* form in two treatments: (i) *C. weissflogii* (collected and offered in the 4<sup>th</sup> day of cultivation) and (ii) control (collected and offered in different days of cultivation). The treatment in which the microalga was collected on the 4<sup>th</sup> day of culture (*C. weissflogii*) presented a higher concentration of total flavonoids and the animals fed this treatment presented higher final survival and greater body size when compared with control group ( $p < 0.05$ ). For water quality parameters, total polyphenols, metamorphosis rate, temperature stress test and generation of reactive oxygen species (ROS) *in vivo*, there were no significant differences. The second experiment consisted of two stages (A and B) with two treatments using the microalgae *C. muelleri* and *C. weissflogii*, collected on the 5<sup>th</sup> day of cultivation and offered as a paste. The stage A lasted from protozoa I to mysis I and stage B from mysis I to post-larva 1. The content of total flavonoids and polyphenols was evaluated on the 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day of culture and It was verified that the 5<sup>th</sup> day presented higher levels of polyphenols and the 7<sup>th</sup> day of flavonoids in the two microalgae species ( $p < 0.05$ ). The *C. muelleri* treatment presented higher final survival in stage A, while in stage B, *C. weissflogii* treatment presented higher final survival and body size of the larvae ( $p < 0.05$ ). For the ROS concentration, a significant reduction in the mysis II was observed in the *C. muelleri* treatment. In post-larvae 1 the two treatments presented a high increase in ROS concentration when compared to the other larval phases ( $p < 0.05$ ). Both microalgae presented important advantages when offered on a specific day of cultivation, and in future studies the supply of a controlled mix of *C. muelleri* and *C. weissflogii* was proposed.

**Key words:** *Chaetoceros muelleri*, *Conticribra weissflogii*, larviculture, ROS, non-enzymatic antioxidants.

## 1. INTRODUÇÃO

O camarão *Litopenaeus vannamei* pertence à família penaeidae de crustáceos decápodos e atualmente está entre uma das espécies de maior comercialização e de maior importância econômica no mercado de produção de organismos aquáticos (FAO 2016). Seu grande sucesso se dá, entre outros motivos, devido a sua alta adaptabilidade a diferentes temperaturas e salinidade, rápido crescimento, resistência a baixos teores de oxigênio, diferentes níveis de nitrogênio, alta produtividade, entre outros (Briggs et al., 2004; Teixeira et al., 2011; Krummenauer et al., 2011; Souza et al., 2016; Cui et al., 2017). Essa espécie conhecida como camarão branco se distribui ao longo da costa do Pacífico da América Central e do Sul e tem seu ciclo de vida em mar aberto, na zona costeira e no estuário (Zhou et al., 2009).

Os camarões penaeídeos possuem 3 estágios larvais, sendo eles de náuplio (dividido em 5 sub-estágios), protozoa e mysis (ambos divididos em 3 sub-estágios) (Figura 1), todos caracterizados por grandes modificações morfológicas (Barbieri & Ostrensky Neto, 2001).



**Figura 1:** Esquema do ciclo de vida do camarão *L. vannamei*.

(Fonte: López-Martínez et al., 2008).

Os náuplios são organismos planctônicos com fototaxia positiva e, portanto procuram se deslocar em direção a luz onde se encontra o fitoplâncton, alimento principal na fase seguinte de protozoa I e determinante para sua sobrevivência. Na fase de náuplio o animal possui reserva vitelínica que irá durar aproximadamente 30 horas (Jones et al., 1997a; Kumlu, 1999) (Figura 2a e 2b). Após o esgotamento das reservas, o animal encontra-se com a mandíbula já formada e está pronto a mudar para a fase seguinte de protozoa I.



**Figura 2:** Camarão *L. vannamei* na fase de náuplio V onde a seta branca indica a reserva vitelínica.

A larva protozoa se alimenta de partículas em suspensão, que na sua maioria são microalgas presentes na coluna d'água. Neste período ocorrem grandes e importantes modificações anatômicas e fisiológicas, como diferenciação entre cefalotórax e abdômen e desenvolvimento do sistema digestório em protozoa I (Figura 3a), formação do rostro, somitos abdominais e pedúnculo ocular em protozoa II (Figura 3b) e surgimento dos urópodos em protozoa III (Figura 3c) (Kitani, 1986).



**Figura 3:** Subestágios da fase de protozoa a do camarão *L. vannamei* onde: (a) protozoa I com trato digestório desenvolvido e cefalotórax e abdômen já divididos, (b) protozoa II com os olhos pedunculados e rostro em formação e (c) protozoa III com os urópodos em desenvolvimento e presença de cordão fecal.

No estágio seguinte de mysis I (Figura 4), a carapaça passa a recobrir o tórax e começam a aparecer os primeiros indícios do surgimento dos pleópodos. Quando chegam a mysis II (Figura 4b), ocorrem modificações nas antenas e os pleópodos formam espécies de brotos, que se transformam em pleópodos segmentados assim que atingem a fase de mysis III, em que o animal passa a perseguir e capturar zooplâncton. A fase larval se encerra quando o animal sofre nova mudança morfológica e é considerado uma pós-larva (Figura 5), com os apêndices funcionais e passando a ser um organismo bentônico. Nesse momento o animal se desloca da zona costeira em direção a ambientes mais protegidos (estuários), onde irá permanecer durante toda a fase de juvenil (Kitani, 1986).



**Figura 4:** Subestágios da fase de mysis do camarão *L. vannamei* onde as setas indicam (a) mysis I com o primórdio dos pleópodos e (b) mysis II com os pleópodos em forma de brotos.

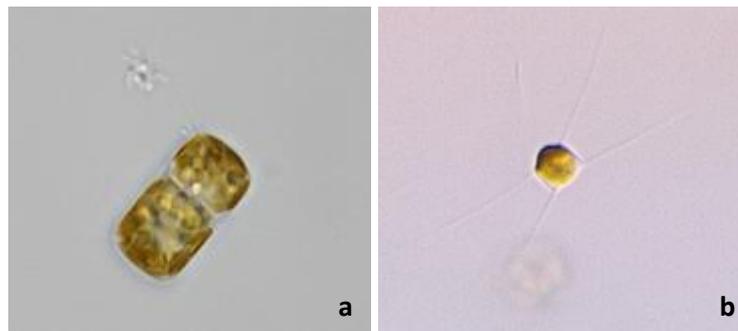
Após as sucessivas metamorfoses e a transformação para juvenil, a migração recomeça com o retorno para a zona costeira, passando pelo estágio de sub adulto, até chegar ao mar aberto na fase adulta, pronto para reproduzir e dar começo a um novo ciclo de vida (Quackenbush, 1991).



**Figura 5:** Pós-larvas de camarão *L. vannamei*.

Nas fases iniciais a primeira alimentação é um fator determinante para a sobrevivência e o crescimento das larvas, pois essas dependem do fornecimento de uma alimentação com quantidade adequada, com boa composição bioquímica, com fácil digestão (relacionada à estrutura e composição da parede celular), assimilação e tamanho correto de partícula, para desta forma não afetar negativamente o desenvolvimento do organismo (Sirvas-Cornejo et al., 2007; Jones et al., 1997b). As microalgas são o alimento principal de grande parte dos animais (moluscos, crustáceos e peixes) em pelo menos uma fase do ciclo de vida, pois são fonte de proteínas (Silva et al., 2008), carboidratos (Lavens & Sorgeloos, 2000) e lipídios (Borges et al., 2011). Para larvas de crustáceos são adequadas, pois atendem ao requerimento de proteína dos animais que varia entre 23 a 55% do peso seco das dietas (Rodriguez et al., 1994).

As diatomáceas pertencem a um grande grupo de microalgas e estão entre as classes mais abundantes em ambientes marinhos (Bonecker et al., 2002), destacando as diatomáceas dos gêneros *Chaetoceros* e *Conticribra* entre as mais cultivadas para o período de larvicultura (FAO 2004; Brown, 2002). A espécie *Conticribra weissflogii* (Figura 6a) é amplamente utilizada por possuírem altas concentrações de proteínas, carboidratos e lipídios. Apresentam células retangulares entre 10 e 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Alfonso & Leal, 1995). A microalga *Chaetoceros muelleri* (Figura 6b) é utilizada devido ao perfil de ácidos graxos, seu tamanho adequado para larvas e também por apresentar a valva pouco silificada, o que propicia menor resistência e facilidade na digestão (Brown et. al., 1997).



**Figura 6:** Microalgas (a) *C. weissflogii* e (b) *C. muelleri*.

(Fonte: [www.google.com.br](http://www.google.com.br))

A obtenção de biomassa com alto padrão nutricional é essencial na aquicultura. Dependendo da escala de produção, os laboratórios de larvicultura podem ter de produzir milhares de litros de cultivos de microalgas por dia (Coutteau & Sorgeloos 1992). A produção de microalgas em larga escala é considerada uma etapa que requer grande atenção, necessita de grandes cuidados (Coutteau & Sorgeloos 1992), demanda alto custo operacional (Guedes & Malcata, 2012) e esse setor pode ser facilmente contaminado, colocando em risco toda a produção. Por esses motivos, pesquisas vêm sendo direcionadas para substituição da microalga *in natura* e a oferta de concentrados de microalgas tem apresentado bons resultados como substituinte (Duerr, et al., 1998; Ponis et al., 2003; Sales, et al., 2016) em cultivos de peixes (Sales et al., 2016), moluscos (Heasman et al., 2000) e crustáceos (D'Souza et al., 2010). A concentração da biomassa também possibilita a criação de um estoque de microalgas coletadas em uma fase de interesse, podendo ser armazenada de 2 a 8 semanas na geladeira a 4 C° sem perder sua integridade (Guedes & Malcata, 2012) e composição bioquímica (carboidratos, ácidos graxos e proteínas) (Sales et al., 2016). A floculação vem sendo empregada para concentrar biomassa de microalgas, pois possibilita uma alta taxa de colheita da biomassa de microalgas com baixo custo (Roselet et al., 2015). O processo de floculação consiste na agregação da biomassa com a finalidade de formar flocos e sua ação pode ocorrer de 4 maneiras: (i) promovendo a adsorção na interface partícula-solução, (ii) através de ligações por pontes de hidrogênio, (iii) por forças hidrofóbicas, (iv) através de ligação química e/ou eletrostática (Oliveira & Rubio, 2011).

Além disso, cada cultivo de microalgas pode assumir características próprias quanto a sua composição, já que essa pode ser variável por influência de fatores abióticos e também pode variar ao longo do tempo de cultivo (Lourenço, 1996). Porém

pouco ainda se sabe sobre a composição bioquímica das microalgas em dias específicos do cultivo. Dessa forma, existe uma necessidade de pesquisas visando conhecer seu metabolismo e os fatores que podem influenciar a composição bioquímica da célula ao longo da curva de crescimento (Lourenço et al., 1997; Borowitzka, 1999; Molina, 2003), já que a biomassa de microalgas é capaz de fornecer compostos de interesse biologicamente ativos aos consumidores, como os antioxidantes (Gouveia et al., 2007; Klejdus et al., 2010; Shanab et al., 2012). Pesquisas vêm sendo conduzidas a fim de determinar a presença de compostos antioxidantes nas microalgas devido as suas amplas aplicações, dentre elas a suplementação animal (Li et al., 2007; Goh et al., 2010; Hajimahmoodi et al., 2010). Os antioxidantes podem estar presentes de forma enzimática (enzimas presentes no organismo) e na forma não enzimática, na qual são adquiridos através da alimentação (como carotenóides e compostos fenólicos). Os antioxidantes são moléculas capazes de inibir ou atrasar a ação deletéria de espécies reativas de oxigênio (ERO), através da doação de um átomo de hidrogênio e a estabilização de uma molécula instável. As ERO possuem um átomo desemparelhado na sua última camada de valência o que as torna reativas com tendência a se estabilizar roubando átomos das moléculas mais próximas, podendo ocasionar uma reação em cadeia. Porém, as ERO também são parte importante na sinalização de apoptose celular e são produzidas naturalmente durante o metabolismo energético (Halliwell, 2006). Para manter-se saudável, um organismo deve equilibrar seu sistema de defesas antioxidantes e suas moléculas pró-oxidantes, um aumento destas últimas por sobre a capacidade do sistema antioxidante pode levar ao estresse oxidativo (EO), podendo acarretar em oxidação de lipídios de membrana, ataque a proteínas e danos no DNA (Radhakrishnan et al., 2014). No entanto uma boa alimentação suplementada com antioxidantes não enzimáticos pode prevenir e proteger os animais contra danos oxidativos (Hwang & Lin, 2002).

Os compostos fenólicos são um importante grupo de antioxidantes com alta habilidade de doar átomos de hidrogênio para estabilizar as ERO (Hajimahmoodi, et al., 2010) e são sintetizados no cultivo ao final da fase log e ao início da fase estacionária (Robbins, 2003). Os polifenóis são um subgrupo dos compostos fenólicos na qual se destaca os flavonoides, metabólitos secundários capazes de inibir o dano oxidativo nos organismos (Pietta, 2000). Estas moléculas possuem alta atividade antioxidante devido sua capacidade de interação com biomembranas e devido algumas especificidades da

sua estrutura química como o número de hidroxilas (quanto mais, maior a atividade como agente doador de H<sup>+</sup> e de elétrons) (Barreiros et al., 2006).

Em consequência ao alto valor econômico da espécie *L. vannamei* diversas pesquisas surgem para obter-se maior conhecimento sobre as exigências e características fisiológicas da espécie (Racotta et al., 2004; Palacios & Racotta, 2007; Cobo et al., 2012; Macias-Sancho et al., 2014; Suita et al., 2015; Suita et al., 2016). Ainda que as pesquisas tenham avançado para a espécie nas fases de pós-larva, juvenil e adulto, poucos são os avanços e disponibilidade de informações para a fase larval, o que deveria ser prioritário e demonstra a grande importância deste tipo de estudo considerando que o sucesso na produção é consequência da qualidade das larvas geradas na larvicultura (Subuntith et al., 2011; Sanudin et al., 2014).

## **2. OBJETIVO GERAL**

O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante de duas espécies de microalgas *C. weissflogii* e *C. muelleri*, ofertadas como alimento para larvas do camarão *L. vannamei* na forma *in natura* ou em pasta e comparar sua influência nas respostas antioxidantes e desempenho zootécnico.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Determinar a capacidade antioxidante das microalgas *C. weissflogii* e *C. muelleri* através da avaliação do conteúdo de flavonoides e polifenóis totais em diferentes dias do cultivo;
- Determinar a influência da alimentação com as microalgas *C. weissflogii* e *C. muelleri* na taxa de virada, sobrevivência final, tamanho corporal, resistência ao teste de estresse de temperatura em larvas de camarão *L. vannamei*;
- Determinar a influência da alimentação com as microalgas *C. weissflogii* e *C. muelleri* na geração de ERO em larvas de camarão *L. vannamei* através da dosagem *in vivo*.

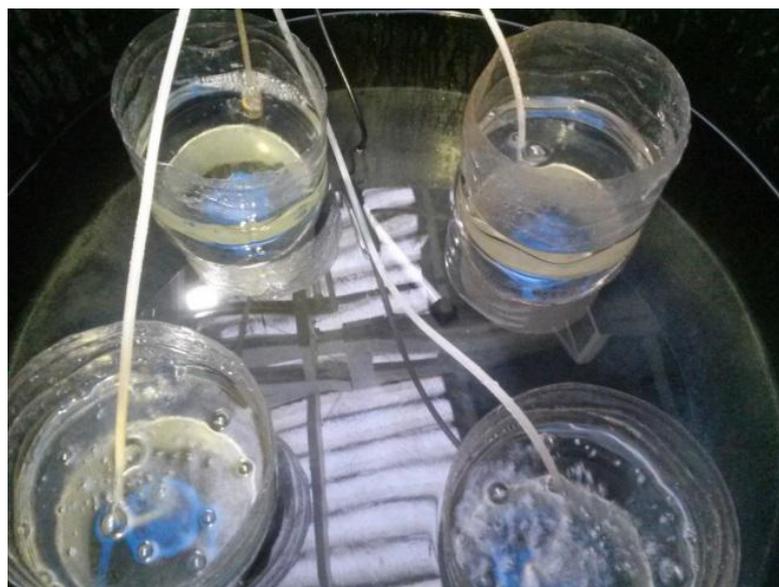
## **3. METODOLOGIA GERAL**

### 3.1 Pré-teste

Previamente ao início dos experimentos foi avaliado o conteúdo de flavonoides totais em extratos das microalgas *C. weissflogii* e *Nannochloropsis oceanica* produzidas na Estação Marinha de Aquicultura. Foram coletadas amostras de algas ao longo de vários dias de produção, sendo as coletadas no 4º e 6º dia as que apresentaram maiores concentrações de flavonoides, especialmente *C. weissflogii*, quando comparada a *N. oceanica*.

### 3.2 Delineamento experimental

Foram realizados três experimentos de larvicultura no Laboratório de Carcinocultura na Estação Marinha de Aquicultura (EMA) – FURG. As larvas utilizadas foram adquiridas do laboratório comercial Aquatec (Rio Grande do Norte) e transportadas para Rio Grande em sacos plásticos de 10L no estágio de náuplio V. Os animais foram aclimatados para as condições dos experimentos. Uma amostra de 100 ml foi retirada assim que os animais chegaram ao laboratório para a realização do teste de fototaxia positiva para avaliação da atividade natatória das larvas recém adquiridas (FAO, 2004). Em seguida, foram estocados aproximadamente 100 organismos/L em cada unidade experimental com volume útil de 3 L, mantidas a uma temperatura de 30 °C e salinidade 30 (Figura 7).



**Figura 7:** Unidades experimentais mantidas em banho termostático.

O primeiro experimento foi conduzido em novembro de 2016 e teve início quando 100% dos animais atingiram a fase de protozoa I e foi finalizado em mysis III. Os camarões foram submetidos a dois tratamentos distintos utilizando a microalga *C. weissflogii in natura*. Ao primeiro tratamento (controle) foi empregado o mesmo regime alimentar utilizado no setor de Larvicultura, onde a microalga é coletada e ofertada como alimento em dias distintos do cultivo e para o segundo tratamento, a microalga (*C. weissflogii*) foi coletada somente no 4º dia de cultivo (Figura 9), armazenada e ofertada ao longo da larvicultura. Cada unidade experimental foi estocada com larvas de camarões e com microalgas, a uma densidade de  $4 \times 10^4$  cel/L, cuja concentração foi mantida através de contagem celular em câmara de Neubauer, com reposição sempre que necessário. Houve renovações de água de 100% todas as manhãs, a fim de manter o fitoplâncton ofertado sempre no 4º dia de cultivo. Ao final do experimento (mysis III) a sobrevivência final e a taxa de virada (percentual de metamorfose) foram contabilizadas e um grupo de cada tratamento foi submetido ao teste de estresse de temperatura (n=30) e um segundo grupo para ensaio do ERO *in vivo* e determinação do tamanho corporal (n=32).

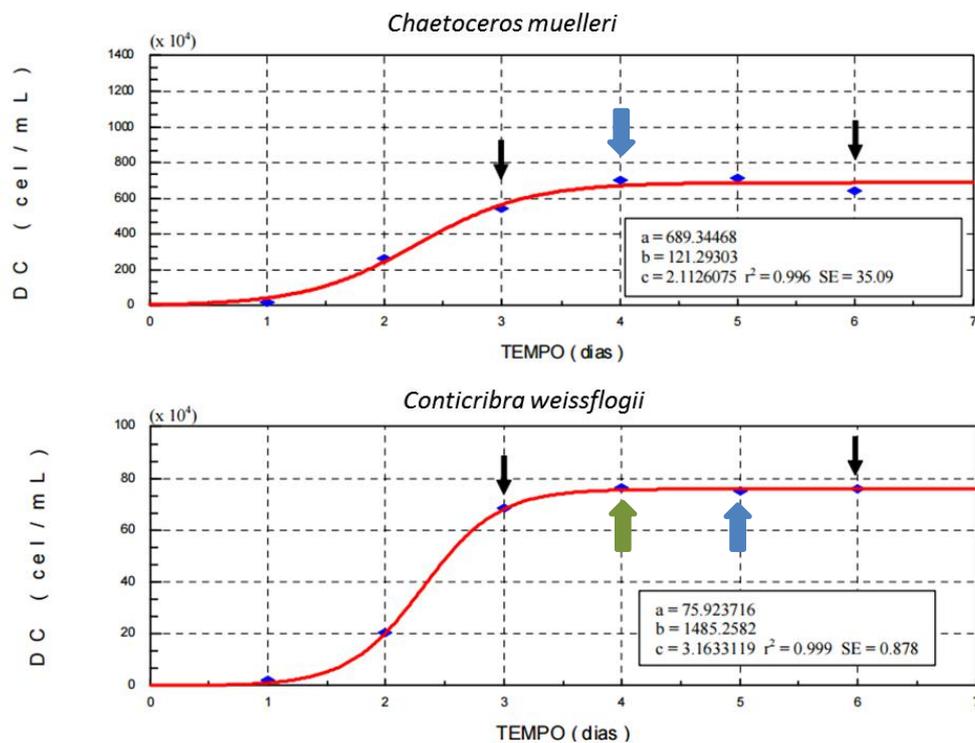
O segundo experimento foi conduzido em abril de 2017 e foi dividido em duas etapas:

**A:** Início do experimento com os organismos em protozoa I e finalizando quando eles chegaram ao estágio mysis I;

**B:** Início do experimento com os organismos em mysis I e finalizando quando eles chegaram ao estágio pós-larva 1.

Para ambas as etapas, os camarões foram submetidos a dois tratamentos distintos: um composto por *C. weissflogii* como alimento e o outro por *Chaetoceros muelleri*. As microalgas foram coletadas no 5º dia cultivo, momento em que ambas as espécies já se encontravam na fase estacionária (Figura 8) e com maior síntese de compostos fenólicos segundo Robbins (2003). Após a coleta, as microalgas foram floculadas e então foram oferecidas na forma de pasta para os animais. Os tratamentos foram estocados e cada unidade experimental foi mantida com uma densidade de microalgas de  $5 \times 10^4$  cel/L. Duas vezes ao dia foram realizadas contagens celulares em câmara de Neubauer e as

concentrações ajustadas sempre que necessário para manter a densidade inicial. Durante o experimento foram coletados animais nas fases de protozoa II (n=96), mysis II (n=96) e pós-larva 1 (n=96) para determinação de ERO *in vivo*. Ao final de cada etapa, a sobrevivência final, sobrevivência ao teste de estresse de temperatura (n=30) e a taxa de virada foram contabilizadas e na fase de pós-larva 1 foi determinado o tamanho corporal dos animais (n=32).



**Figura 8:** Curva de crescimento dada pela densidade celular (cel/mL) durante o tempo de cultivo (dias) para as microalgas *C. muelleri* e *C. weissflogii* onde as setas pretas indicam a transição entre o fim da fase log e da fase estacionária, a seta verde indica o dia de coleta e oferta da microalga no 1º experimento e as setas azuis indicam o dia de coleta e oferta da microalga no 2º experimento (Fonte: adaptado de Derner, 2005).

Em todos os experimentos a partir da fase de protozoa III foram ofertados, em conjunto com a microalga avaliada, náuplios congelados de *Artemia* sp. fornecidos duas vezes ao dia (manhã e noite).

### 3.3 Parâmetros de qualidade de água

Toda a água utilizada neste experimento foi esterilizada com hipoclorito de sódio (15 ppm) adicionado a água do mar filtrada, mantido por no mínimo 2 horas e neutralizada com ácido ascórbico (1 ppm). A aeração foi mantida constante por meio de soprador e pedras porosas colocadas individualmente em cada unidade experimental. Valores de oxigênio dissolvido, temperatura (oxímetro YSI 55), pH (pHmetro YSI 100), amônia (Unesco, 1983) e nitrito (Strickland & Parsons, 1972) foram mensurados diariamente.

No experimento 1, após mensurar os parâmetros de qualidade da água no período da manhã, foi realizada renovação da água de 100% do volume total diariamente.

Para o experimento 2 a amônia e o nitrito foram aferidos ao início e ao final de cada etapa utilizando a mesma metodologia já descrita com renovação somente se a amônia atingisse níveis de 1 mg/L.

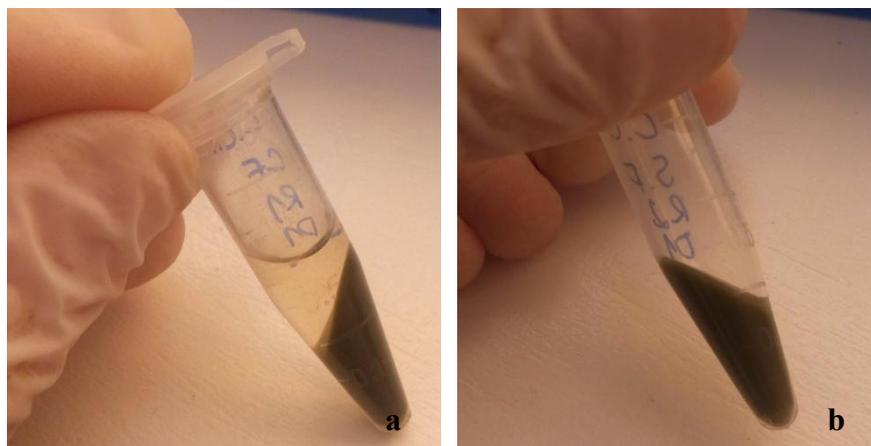
### 3.4 Cultivo e coleta das microalgas

As cepas de *C. muelleri* e *C. weissflogii* (anteriormente denominada *Thalassiosira weissflogii*) utilizadas neste estudo foram obtidas do Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos – EMA, cultivadas em meio F/2, modificado segundo Guillard (1975). Esse meio foi escolhido por ser adequado para o cultivo de diatomáceas marinhas, composto por: 150 g L<sup>-1</sup> de nitrato, 9 g L<sup>-1</sup> de fosfato e 6 g L<sup>-1</sup> silicato, além de micronutrientes.

Previamente ao início dos experimentos, as cepas foram cultivadas em Erlenmeyer de 2 L e após o cultivo foi transferido para unidades experimentais de cultivo com volume de 20 L. As unidades experimentais foram preenchidas com 18L de água marinha (previamente filtrada e esterilizada), 1 mL L<sup>-1</sup> de meio F/2 e 2L de cultivo microalgal. Os cultivos foram mantidos com agitação e iluminação constante (fotoperíodo de 24:0), em salinidade 30, pH em torno de 8,0, temperatura em torno de 30. Para o experimento 1 os cultivos foram repicados diariamente a fim de sempre tem estoque de microalga no 4º dia de cultivo.

A coleta ocorreu quando as mesmas atingiram a fase de interesse para cada tratamento. No primeiro experimento a microalga *in natura* foi coletada (2 L) e centrifugada (2439 x g por 15 minutos a 5 °C) a fim de concentrar a biomassa. O

sobrenadante foi descartado e a biomassa armazenada para posteriores análises (Figura 9). Os tratamentos foram inoculados nas unidades experimentais a uma densidade de  $4 \times 10^4$  cel/mL.



**Figura 9:** Coleta da biomassa no experimento 1 onde (a) biomassa de microalga após a centrifugação e (b) biomassa restante após descartar o sobrenadante (imagens da autora).

Já no segundo experimento, o volume foi coletado após a adição do flocculante Flopam® (5 ppm). Para isto, utilizou-se o método modificado de Roselet et al. (2015) onde o meio de cultivo foi agitado vigorosamente para formar um vortex central, a solução flocculante foi adicionada seguida de uma última agitação lenta para permitir a formação dos flocos. Após a decantação (30 min) a pasta formada foi coletada e armazenada na geladeira para ser utilizada ao longo do experimento e para as análises posteriores. Os tratamentos foram inoculados nas unidades experimentais a uma densidade de  $5 \times 10^4$  cel/mL.

### **3.5 Extração dos pigmentos, dosagem de flavonoides e polifenóis totais**

A extração ocorreu com a homogeneização das amostras em metanol (1:5, P/V) e permaneceu três horas sob agitação constante e sem iluminação (4 °C). Após, foram centrifugadas a 4000 x g por 5 minutos (4 °C). O sobrenadante foi retirado e armazenado em eppendorfs para as análises.

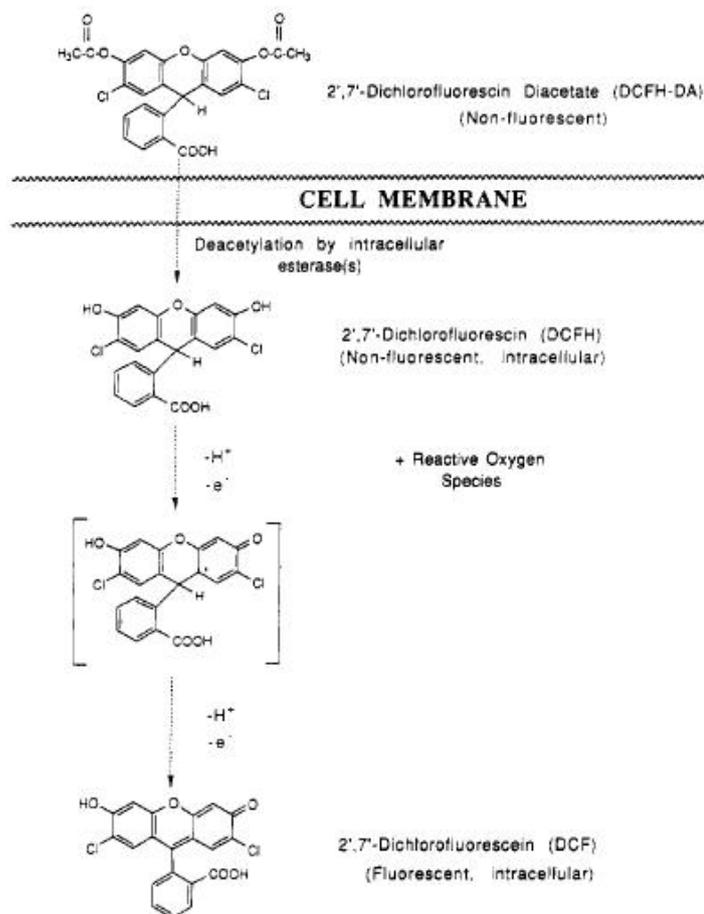
A determinação do teor de flavonoides foi feita seguindo o método descrito por Moura (2009), utilizando  $AlCl_3$  como agente para reagir com os flavonoides gerando

um complexo cuja absorvância a 450 nm foi determinada por espectrofotômetro em leitora de microplacas (Biotek Elx 800).

Os polifenóis totais foram quantificados pelo método modificado de Peixoto et al. (2016). Foi adicionado 1,25 ml do reagente Folin-Ciocalteu 0,1 M a 50 µl de extrato. Após 5 min, foi adicionado 1 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5% (P/V). Após 60 min de incubação no escuro foi lido em espectrofotômetro a 740 nm.

### **3.6 Determinação de ERO *in vivo* por fluorescência**

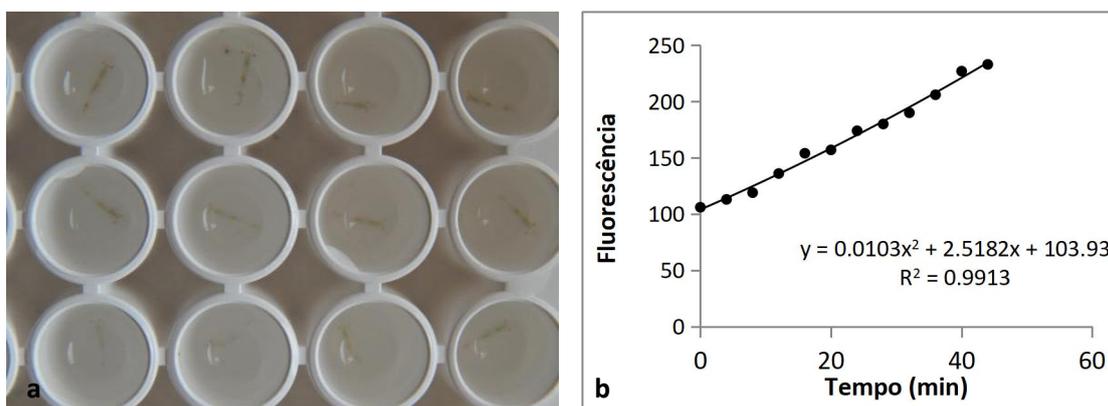
A produção de espécies reativas de oxigênio em larvas de *L. vannamei* foi medida pelo método de H<sub>2</sub>DCFDA modificado de Xie et al. (2006). Uma solução estoque (0,5 mg DCF em 4,275 ml metanol) foi diluída para uma concentração de 0,0117 mg/mL de DCF. Uma solução de exposição foi preparada a partir da solução estoque (35 µL em 2,965 ml de etanol). O DCFH-DA é um composto amplamente utilizado por possuir permeabilidade celular, que facilita o carregamento e a acumulação intracelular. Após sofrer dissociação pelas esterases não específicas em DCFH (não fluorescente) é oxidado em DCF e é retido dentro da célula produzindo fluorescência (Ortega-Villasante et al., 2016) (Figura 10).



**Figura 10:** Proposta do mecanismo de entrada do DCFH-DA nas células (fonte: Lebel et al., 1992).

As larvas foram cuidadosamente transferidas de forma individual para poços de uma microplaca contendo 150  $\mu\text{L}$  de água marinha filtrada e logo depois foi adicionado rapidamente 10  $\mu\text{L}$  de solução de exposição (Figura 11a). A placa foi lida imediatamente em espectrofotômetro (Biotek Elx 800) durante 30 minutos com fluorescência monitorada a cada 3 minutos em um comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 530 nm (Figura 11b).

Após o termino, em mysis III no exérimento 1 e pós-larva 1 experimento 2, os animais utilizados nesse ensaio tiveram o comprimento do corpo (da ponta do rostro à ponta do telson) medidos com auxílio de uma folha milimetrada.



**Figura 11:** Imagens do ensaio de geração de ERO *in vivo* no experimento 1, onde (a) montagem da microplaca com as pós larvas nas poças e (b) leitura de fluorescência ao longo do tempo (minutos) de ensaio (imagens da autora).

### 3.7 Teste de estresse de temperatura

Para realização do teste de estresse de temperatura foi feita uma adaptação dos métodos descritos por Wang & Chen (2006) e Martins (2006). Ao final do experimento um grupo de  $n=30$  animais de cada tratamento foram retirados das unidades experimentais (28 °C) e transferidos para unidades previamente preparadas com temperatura 10 °C menor que a inicial do experimento (18 °C) onde permaneceram durante 30 minutos. Depois de transcorrido o tempo, os animais foram novamente transferidos para as condições de cultivo normais (28 °C) permanecendo por 30 minutos. Após este período, os animais foram observados durante 10 minutos para verificar a atividade das larvas e sobrevivência.

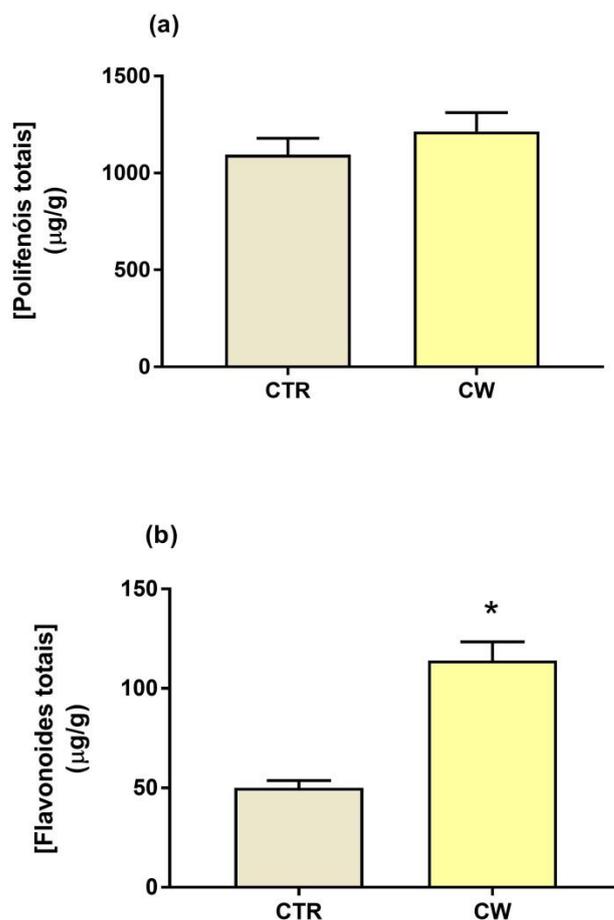
### 3.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas após serem avaliadas normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Levene) e quando preciso, foram feitas transformações matemáticas para atender as premissas. Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a influência das diferentes alimentações na capacidade antioxidante do camarão. O teste de Newman-Keuls foi realizado para verificar diferenças entre médias com nível de significância empregado para todos os testes de 5%. Para os dados de sobrevivência foi utilizada análise não paramétrica (teste de chi-quadrado, com  $\alpha=0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Flavonoides e polifenóis totais nas microalgas-

No experimento 1, para polifenóis totais não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos (Figura 12a). Para flavonoides totais o tratamento *C. weissflogii* apresentou teores significativamente maiores do que o tratamento controle (Figura 12b).

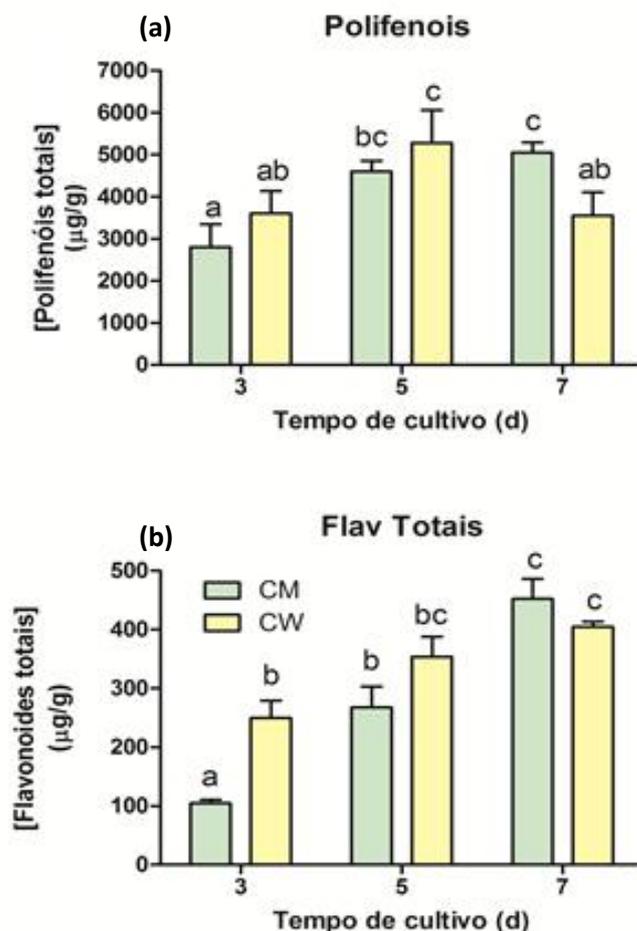


**Figura 12:** Conteúdo de (a) polifenóis totais (b) flavonoides totais nos tratamentos controle (CTR) e *C. weissflogii* (CW). O asterisco (\*) indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

No experimento 2, o tratamento *C. muelleri* mostrou aumento na concentração de polifenóis totais ao longo do tempo, sendo no 5º e o 7º dia observados os maiores teores para o composto. Para o tratamento *C. weissflogii* o 5º dia apresentou altas

concentrações de polifenóis totais quando comparado ao 3º e ao 7º dia de cultivo (Figura 13a).

Para ambos os tratamentos foi observado um aumento na concentração de flavonoides totais à medida que o tempo de cultivo transcorria. Somente no 3º dia foi encontrada diferença significativa entre as microalgas *C. muelleri* e *C. weissflogii*. Altas concentrações de flavonoides foram observadas no 7º dia de cultivo (Figura 13b).



**Figura 13:** Concentração de (a) polifenóis totais e (b) flavonoides totais nos extratos das microalgas *C. muelleri* (CM) e *C. weissflogii* (CW) coletadas em três dias distintos (3º, 5º e 7º) da curva de crescimento. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 4.2 Parâmetros de qualidade de água

A média dos resultados obtidos para temperatura, pH, oxigênio dissolvido e amônia para ambos os experimentos estão apresentados na Tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos durante nenhum dos experimentos.

**Tabela 1** – Resultados dos parâmetros físico-químicos da água (média  $\pm$  erro padrão) como temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH, oxigênio dissolvido (mg/L) e amônia (mg N-AT/L) no experimento 1 nos tratamentos controle (microalga coletada em dias distintos) *C. weissflogii* (microalga coletada no 4 $^{\circ}$  dia de cultivo) e no experimento 2 nos tratamentos *C. weissflogii* (microalga coletada no 5 $^{\circ}$  dia de cultivo) e *C. muelleri* (microalga coletada no 5 $^{\circ}$  dia de cultivo).

Experimento	Tratamento	Temperatura	pH	Oxigênio dissolvido	Amônia
1	Controle	28,7 ( $\pm$ 0,22)	8,25 ( $\pm$ 0,01)	7,26 ( $\pm$ 0,07)	0,01 ( $\pm$ 0,18)
	<i>C. weissflogii</i>	29,0 ( $\pm$ 0,29)	8,22 ( $\pm$ 0,01)	7,41 ( $\pm$ 0,04)	0,01 ( $\pm$ 0,20)
2A	<i>C. weissflogii</i>	29,2 ( $\pm$ 0,12)	8,07 ( $\pm$ 0,01)	4,05 ( $\pm$ 0,08)	0,00 ( $\pm$ 0,00)
	<i>C. muelleri</i>	30,9 ( $\pm$ 0,26)	8,10 ( $\pm$ 0,02)	3,81 ( $\pm$ 0,07)	0,01 ( $\pm$ 0,00)
2B	<i>C. weissflogii</i>	30,3 ( $\pm$ 0,59)	7,82 ( $\pm$ 0,05)	4,85 ( $\pm$ 0,11)	0,02 ( $\pm$ 0,13)
	<i>C. muelleri</i>	30,2 ( $\pm$ 0,11)	7,49 ( $\pm$ 0,12)	4,77 ( $\pm$ 0,12)	0,03 ( $\pm$ 0,17)

## 4.3 Desempenho zootécnico

No experimento 1, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para a taxa de virada e a sobrevivência final ( $p>0,05$ ). O tratamento *C. weissflogii* apresentou maior sobrevivência após o teste de estresse e tamanho corporal significativamente maior do que o tratamento controle (Tabela 2);

**Tabela 2:** Dados da taxa de virada (dias), sobrevivência final (%), sobrevivência ao teste de estresse (%) ( $n=30$ ) e tamanho corporal (mm) ( $n=32$ ) de larvas em fase de mysis III alimentadas com os tratamentos controle (microalga coletada em dias distintos) *C. weissflogii* (microalga coletada no 4 $^{\circ}$  dia de cultivo). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p<0,05$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

Tratamento	Taxa de virada	Sobrevivência final	Sobrevivência teste de estresse	Tamanho corporal
Controle	8	85 <sup>a</sup>	83 <sup>a</sup>	5,16 <sup>a</sup>
<i>C. weissflogii</i>	8	100 <sup>a</sup>	97 <sup>b</sup>	6,16 <sup>b</sup>

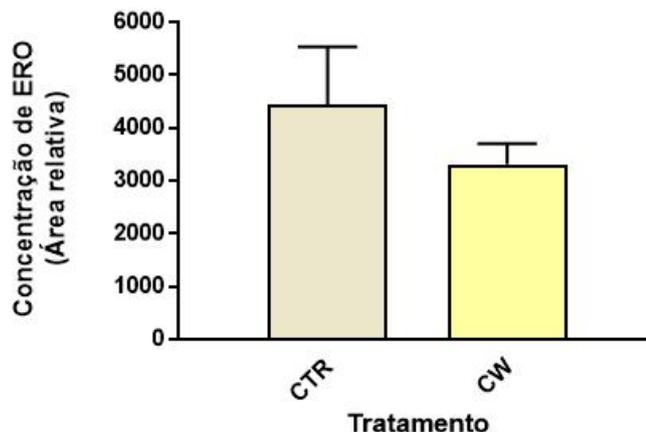
Para o experimento 2, foi observado diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ) na etapa A, sendo o tratamento com a microalga *C. weissflogii* o que apresentou menor tempo para chegar até a fase final de mysis I. Foi observada diferença significativa entre os tratamentos na sobrevivência final, mas não houve diferenças entre os tratamentos para nenhuma das etapas após o teste de estresse. Na etapa B os animais alimentados com tratamento *C. weissflogii* apresentaram tamanho corporal significativamente maior do que os do tratamento *C. muelleri* (Tabela 3).

**Tabela 3:** Dados da taxa de virada (dias), sobrevivência final (%), sobrevivência ao teste de estresse (%) ( $n=30$ ) e tamanho corporal (mm) ( $n=32$ ) de larvas em fase de pós-larva 1 alimentadas com os tratamentos *C. weissflogii* (microalga coletada no 5º dia de cultivo) e *C. muelleri* (microalga coletada no 5º dia de cultivo). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

Experimento	Tratamento	Taxa de virada	Sobrevivência final	Sobrevivência teste de estresse	Tamanho corporal
<b>2A</b>	<i>C. weissflogii</i>	4	16 ( $\pm 16,42$ ) <sup>a</sup>	90 ( $\pm 2,25$ ) <sup>a</sup>	-
	<i>C. muelleri</i>	5	75 ( $\pm 4,62$ ) <sup>b</sup>	70 ( $\pm 1,75$ ) <sup>a</sup>	-
<b>2B</b>	<i>C. weissflogii</i>	4	30 ( $\pm 12,39$ ) <sup>a</sup>	83 ( $\pm 2,09$ ) <sup>a</sup>	6,50 ( $\pm 0,24$ ) <sup>a</sup>
	<i>C. muelleri</i>	4	12 ( $\pm 12,34$ ) <sup>b</sup>	70 ( $\pm 1,75$ ) <sup>a</sup>	5,55 ( $\pm 0,24$ ) <sup>b</sup>

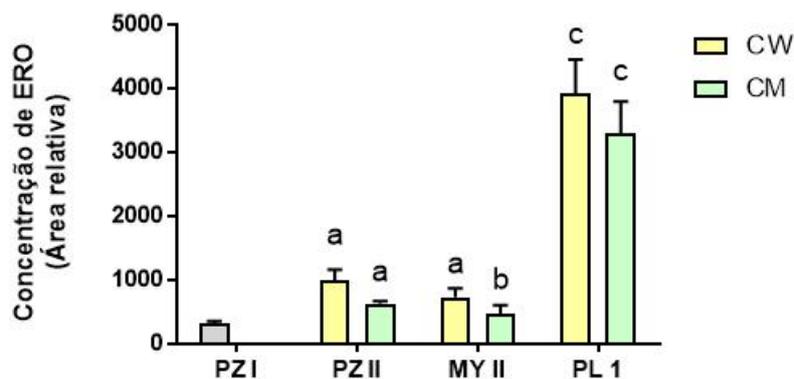
#### 4.4 Determinação de ERO *in vivo*

Não houve diferenças ( $p>0,05$ ), no experimento 1, na concentração de ERO dos organismos entre os tratamentos controle (CTR) e *C. weissflogii* (CW) (Figura 14).



**Figura 14:** Concentração de ERO gerada para os tratamentos controle (CTR) e *C. weissflogii* (CW) ao final do experimento 1 na fase de mysis III (n=32). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

Os resultados da produção de ERO no experimento 2 estão apresentados na figura 15. O primeiro dado na fase de protozoa I nos mostra os níveis basais dos animais utilizados no experimento. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos para protozoa II ( $p>0,05$ ). Em mysis II o tratamento *C. muelleri* apresentou redução na concentração de ERO quando comparado ao tratamento *C. weissflogii*. A fase de pós-larva 1 teve uma elevada produção de ERO para ambos os tratamentos, apresentando diferença significativa quando comparada com as outras fases larvais, porém não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p>0,05$ ).



**Figura 15:** Concentração de ERO geradas nas fases de protozoa I (níveis basais), protozoa II (n=96), mysis II (n=96) e pós-larva 1 (n=32) para os tratamentos *C. weissflogii* (CW) e *C. muelleri* (CM). Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## 5. DISCUSSÃO

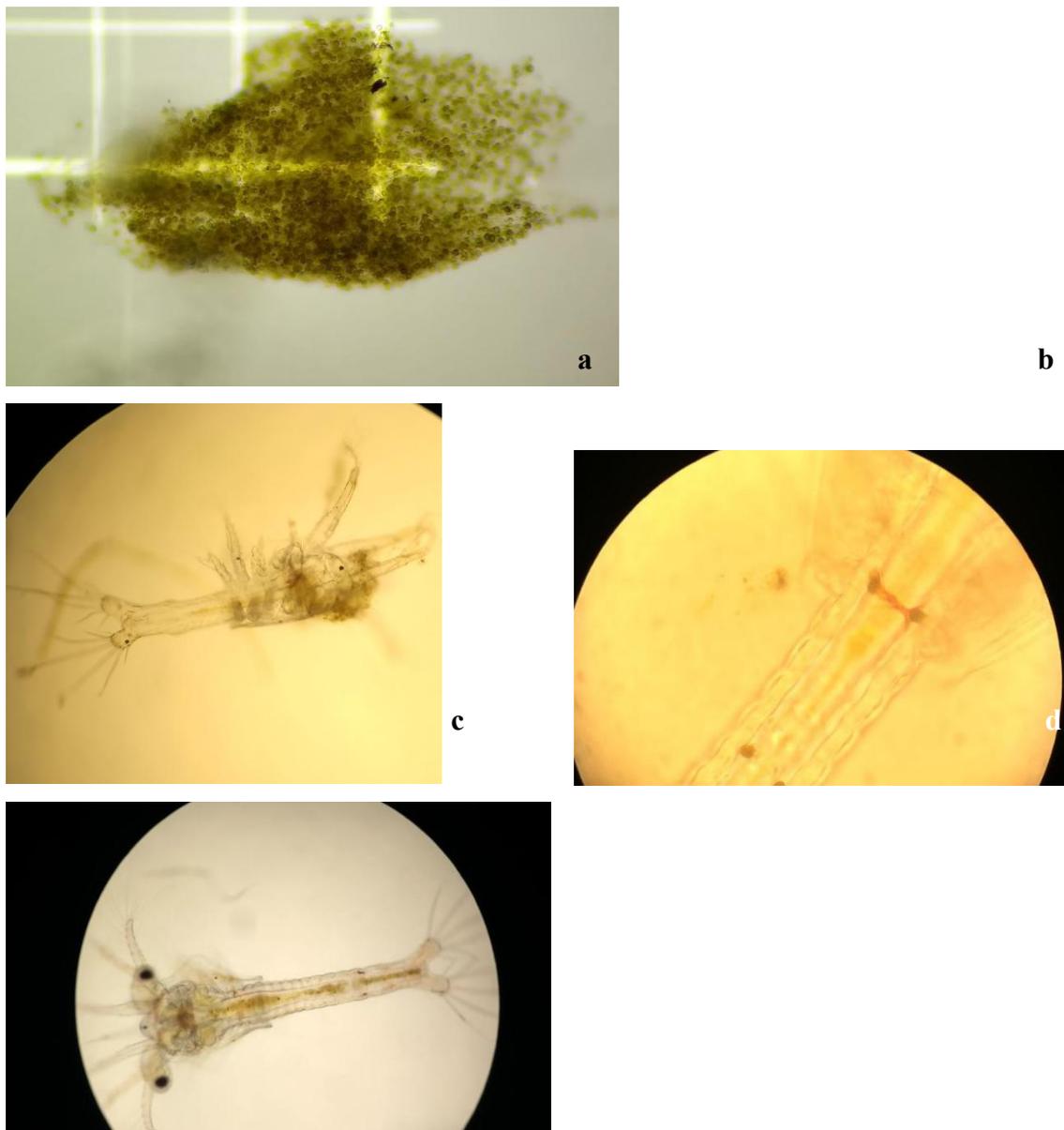
No setor de larvicultura a qualidade da água pode ser rapidamente degradada dificultando o crescimento, aumentando a mortalidade e a ocorrência de doenças (Decamp, et al., 2008; Cobo et al., 2012). Um estudo realizado por Beletini et al. (2011) mostrou que o tipo de alimento influencia na qualidade da água e observou que a microalga *Thalassiosira weissflogii* pode assimilar e diminuir as concentrações de amônia e fósforo em cultivos de pós-larvas de *L. vannamei* quando não há renovação de água. No experimento 1 deste trabalho todos os parâmetros físico-químicos da água foram mantidos através de renovações diárias, favorecendo para que os valores médios de pH (próximo a 8), oxigênio dissolvido ( $> 5$  mg/L), amônia ( $< 1,0$  mg/L) e temperatura ( $28^{\circ}$  -  $32^{\circ}$ ) se mantivessem dentro dos limites e das recomendações técnicas da FAO (2004) para o período de larvicultura. O mesmo ocorreu para o experimento 2 em ambas as etapas, onde os parâmetros de qualidade de água também se mantiveram dentro dos limites de segurança determinados por Marchiori (1996). Belletini et al. (2011), utilizando pós-larvas de *L. vannamei* alimentadas com *T. weissflogii* obteve resultados dentro dos índices recomendados pela FAO (2004) para pH (7,95) e oxigênio dissolvido ( $> 5,00$  mg/L) mas acima do recomendado para amônia (1,88 mg/L). Os baixos índices para oxigênio dissolvido encontrados no experimento 2

pode estar associado a utilização de flocculantes que ocasionou excesso de grumos de microalgas dentro das unidades experimentais que possivelmente foi o responsável por obstruir ou colmatar as pedras porosas usadas no experimento.

O tamanho da microalga ofertada como alimento também é um fator determinante para a sobrevivência na fase de larvicultura (Barbieri & Ostrensky, 2001). Os mesmos autores citam que o tamanho celular da microalga deve variar entre partículas <53 µm para o início da fase larval em protozoa e de 125 - 250 µm para ser adequada à alimentação de larvas de camarões em estágios mais avançados, já que o sistema digestivo nesta período encontra-se em constantes modificações, principalmente durante a metamorfose de protozoa para mysis. Neste estudo no experimento 1, obtivemos alta sobrevivência de 85% e 100% para o tratamento controle e *C. weissflogii*, respectivamente, corroborando com Belettini e colaboradores (2011) em que obtiveram altos índices (>90%) de sobrevivência para pós-larvas alimentadas com *T. weissflogii* e *N. oculata*. Marchiori (1967) descreveu para *Penaeus paulensis* um limite aceitável na mortalidade de até 30% para a espécie durante a larvicultura. Porém, no segundo experimento obtivemos uma menor sobrevivência em diferentes fases. Na etapa A, o tratamento com a microalga *C. muelleri* apresentou maior sobrevivência final (75%) enquanto na etapa B, o tratamento *C. weissflogii* apresentou maior sobrevivência final (16%). As diferenças podem estar ligadas ao tamanho mais adequado de cada espécie de microalga para cada fase larval, sugerindo que nas fases de protozoa e mysis há uma seletividade no tamanho dos alimentos pelos animais (Villegas & Kanuza, 1979). Em contrapartida, um estudo realizado por D'Souza et al. (2002) utilizando alimento em pasta obteve alta sobrevivência (>75%) para larvas de *Penaeus monodon* alimentadas com pasta de *C. muelleri* e *Thalassiosira pseudonana* e baixa sobrevivência para pasta de *C. calcitrans* (<17%) e *Skeletonema sp.* (45%).

A menor sobrevivência obtida ao final do experimento 2 pode estar associada ao fato das microalgas terem sido ofertadas em forma de pasta, já que nas fases larvais os animais necessitam de alimento constante e disponível na coluna d'água (Barbieri & Ostrensky, 2001) e o fato de ter sido utilizado flocculante para coleta das microalgas pode ter influenciado na formação de aglomerados de células dentro das unidades experimentais, tornando o alimento menos disponível (Figura 16). A formação de grumos de microalgas sobre as larvas pode ter aumentado as incrustações na superfície corporal do animal podendo levar a problemas durante a muda (Barbieri & Ostrensky, 2001; Samocha et al., 1989). Além disso, os baixos resultados para sobrevivência pode

estar associado a presença de algum patógeno (não monitorado) no cultivo ou problemas na qualidade do lote.



**Figura 16:** Imagens do experimento 2 onde (a) grumo de células após floculação, (b) vista lateral do animal com microalga aderida a superfície corporal e com ausência de alimento no trato digestório, (c) trato digestório sem alimento e (d) animal com trato digestório com presença de alimento.

Para avaliar a qualidade dos lotes gerados, a FAO (2004) indica que os laboratórios devem realizar teste de estresse em amostras aleatórias coletadas de cada unidade experimental e os resultados devem indicar sobrevivência superior a 75% após o teste. A temperatura da água é um parâmetro importante para organismos aquáticos, pois pode

influenciar na sobrevivência e na produção de ERO (Wang & Chen, 2006; Na & Choi, 2010). No presente estudo, a qualidade das larvas foi avaliada através do teste de estresse de temperatura onde obtivemos sobrevivência >80% para os tratamentos controle e *C. weissflogii* no experimento 1. Os resultados obtidos corroboram com o encontrado por Belettini et al. (2011), que submetem larvas de camarão alimentadas com *T. weissflogii* ao teste de estresse salino, obtendo resultados de sobrevivência acima de 90%. No segundo experimento, na etapa A, o tratamento *C. weissflogii* apresentou melhor desempenho que o tratamento *C. muelleri* e na etapa B não foi observada diferença entre larvas alimentadas com *C. weissflogii* e *C. muelleri*. Um estudo realizado por Racotta e colaboradores (2004), demonstrou sobrevivência de 64% após teste de estresse de salinidade para animais alimentados com o mix de microalgas (*Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira pseudonana*). Martins et al. (2006) obtiveram alta sobrevivência ao teste de estresse de temperatura (17°) para larvas de *Farfantepenaeus paulensis* alimentados com *C. muelleri*, *T. fluviatilis* e *Artemia sp.* Os autores Palacios & Racotta (2007) sugerem em seu trabalho que a sobrevivência dos animais após o teste de estresse pode ser influenciada pela alimentação ofertada, consequentemente a dieta adequada irá produzir pós-larvas com maior sobrevivência ao teste de estresse, mas não necessariamente com maior sobrevivência final e crescimento.

As diatomáceas apresentam valor nutricional adequado para crustáceos em termos de proteínas (30 – 40%), lipídios (10 a 20%) e carboidratos (5 a 15%) (Brown et al., 1997; Brown et al., 1993) e são amplamente utilizadas na alimentação animal em função de possuir os nutrientes essenciais aliados a sua alta digestibilidade (Barreto & Cavalcanti, 1997; Derner, 2006), fatores essenciais para o desenvolvimento e crescimento dos camarões (Dantas et al. 2007). Um estudo realizado por Emmerson (1980) com larvas de *Penaeus indicus* alimentadas com *T. weissflogii*, apresentou tamanho corporal médio de 5,2 mm na fase de pós-larva 1. Neste estudo, os animais apresentaram tamanho corporal médio variando entre 5,16 mm e 6,16 mm para o experimento 1 e 5,55 mm e 6,5 mm para *C. muelleri* e *C. weissflogii*, consecutivamente, no experimento 2. Kitani (1986) descreveu em seu trabalho o desenvolvimento larval do camarão *L. vannamei* no qual encontrou média corporal para mysis III entre 3,68 - 3,80 mm. Lima e colaboradores (2007) utilizando a microalga *T. weissflogii* em combinação com náuplios de *Artemia*, obtiveram um valor médio de 6,4 mm para *L. vannamei* na fase de pós-larva 2, evidenciando o bom crescimento alcançado por esta

pesquisa. Martins e colaboradores (2006) utilizando larvas de *Farfantepenaeus paulensis* alimentados com cultivo fresco de *C. muelleri* e *T. fluviatilis* e *Artemia sp.* encontraram valores entre 5,83 mm e 5,93 mm quando atingiram a fase de pós-larva 1. O bom desenvolvimento dos animais alimentados com a microalga *C. weissflogii* também pode ser observado pela maior velocidade na taxa de virada. Os animais alimentados com esse tratamento na etapa A fizeram a muda até o estágio de mysis I com um dia a menos que o tratamento *C. muellerii*, completando a fase larval em 4 dias. Em laboratório de larvicultura, um dia a menos na produção pode trazer vantagens quanto ao número de larviculturas possíveis, menos tempo de mão de obra e significar um dia a menos com gasto de ração e produção de fitoplâncton, além dos gastos com renovação de água, manutenção e riscos de contaminação.

Estudos vêm sendo realizados a fim de conhecer mais sobre a composição da biomassa de microalgas, sendo os antioxidantes um dos compostos que recebem grande atenção (Mallick & Mohn, 2000; Gouvea et al, 2007; Goiris et al, 2012; Choochote et al, 2014). Ainda há poucas informações sobre as funções dos compostos fenólicos em microalgas, no entanto estudos realizados por Geetha et al (2010) e Custódio et al (2011) mostraram que os extratos de microalgas com altos teores de compostos fenólicos possuíam alta capacidade antioxidante. Goiris e colaboradores (2012) avaliaram o conteúdo fenólico de 32 espécies de microalgas e destacou as do gênero *Isochrysis*, *Phaeodactylum* e *Tetraselmis* com teores > 3 mg/g de compostos fenólicos. Choochote & Suklampoo (2014) encontraram concentrações de 35 mg/g para conteúdo fenólico no extrato da microalga verde *Chlorella sp.* Klejdus et al. (2010) mostraram que várias classes de flavonoides, como isoflavonas, flavanonas e flavonóis podem ser encontradas em microalgas. Neste estudo obtivemos concentrações de polifenóis >1.000 µg/g e de flavonoides variando de 50 µg/g até 114 µg/g para os tratamentos para controle e *C. weissflogii*. No experimento II encontramos variações no conteúdo de polifenóis e flavonoides totais ao longo da curva de crescimento variando entre o tratamento *C. weissflogii* (<400 µg/g e <6.000 µg/g) e *C. muelleri* (<300 µg/g e <5.000 µg/g). Um estudo realizado por Gómez et al. (2016) avaliou a quantidade de polifenóis totais em pasta de *T. weissflogii* e *C. muelleri* coletadas no 6º dia de cultivo, através de floculação com sulfato de alumínio, obtendo resultados de 0,58 e 0,32 mg/g peso seco, respectivamente. A capacidade antioxidante de um determinado composto pode ser mensurada através da determinação de ERO, porém os antioxidantes podem apresentar

dinâmicas diferentes quando testadas *in vitro* e *in vivo*, podendo sofrer metabolizações complexas. Essa variabilidade entre as duas formas faz com que seja necessário o acompanhamento *in vivo* do composto de interesse a ser produzido (Suzuki et al., 2012). Halliwell (2008) citou a necessidade da realização de teste *in vitro* e *in vivo*, de substâncias antioxidantes e formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), já que algumas substâncias podem mudar suas propriedades quando aplicadas em modelos *in vivo*.

Poucos estudos são encontrados na literatura utilizando a técnica de medição de ERO *in vivo* em crustáceos, porém já é empregada por outros autores utilizando o crustáceo de água doce *Daphnia magna* para avaliar geração de ERO *in vivo* e capacidade antioxidante de diferentes compostos (Xie et. al., 2006; Kim et al., 2009). LeBel e colaboradores (1992) destacaram a técnica utilizando DCF com potencial para avaliar a influência de antioxidantes no animal vivo, já que esse é um composto pouco específico para as diferentes espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Xie e colaboradores (2006) avaliaram a capacidade antioxidante do ácido ascórbico em *D. magna* expostas a diferentes contaminantes e mediram com H<sub>2</sub>DCFDA a geração de ERO. No mesmo estudo os autores verificaram um efeito positivo do ác. ascórbico nos organismos, capaz de reduzir mais de 50% a geração de ERO. No primeiro experimento realizado neste estudo, observamos uma tendência a menor concentração de ERO pelos animais alimentados com a microalga CW utilizada em um dia específico do cultivo. No segundo experimento houve uma redução de ERO, na fase de mysis II para o grupo de animais alimentados com *C. muelleri*, e um aumento significativo na fase de pós-larva 1 para ambos os tratamento, o que pode ter sido provocado devido ao desenvolvimento ontogenético dos organismos, maior atividade natatória ou ativação sistema de defesa do organismo para sinalização celular contra invasão de patógenos (Cerenius et al., 2010) . Lobato et al (2013) mostraram que a suplementação com ácido lipóico pode diminuir as concentrações de ERO hepatopâncreas de *L. vannamei*, sugerindo que a suplementação com antioxidantes na dieta é benéfica e pode ser utilizada como estratégia contra danos oxidativos dos organismos em sistemas de cultivo.

Kumlu (1997) sugere que a utilização de um “mix” de microalgas para camarões peneídeos favorece o desenvolvimento sobrevivência devido ao maior equilíbrio na oferta de nutrientes. Neste estudo podemos verificar que ambas as microalgas coletadas em dias específicos do cultivo apresentaram vantagens importante no seu uso, onde a

microalga *C. muelleri* pode favorecer o sistemas de defesa antioxidantes dos animais enquanto *C. weissflogii* favoreceu o desempenho zootécnico, mostrando que a oferta de uma mistura controlada de microalgas pode ser uma boa alternativa para a produção de pós-larvas de qualidade.

## CONCLUSÃO

A oferta da microalga *C. muelleri* e *C. weissflogii* em dias específicos do cultivo pode favorecer a ingesta de antioxidantes não enzimáticos auxiliando no bom desenvolvimento dos organismos. A determinação da concentração de flavonoides totais na microalga *C. weissflogii* coletada em diferentes dias do cultivo, demonstrou uma elevada concentração desse tipo de composto no 4º dia de crescimento. A oferta dessa microalga como alimento para larvas de camarão *L. vannamei* em um dia específico do cultivo pode favorecer a maior sobrevivência final, resistência a diferentes tipos de estresse e melhor crescimento dos animais.

Apesar das melhores respostas apresentadas pela microalga *C. weissflogii* para o desempenho zootécnico, as larvas protozoa alimentadas com a microalga *C. muelleri* coletada no 5º dia em que há grande síntese de polifenóis, apresentaram redução nas concentrações de ERO medidas de forma *in vivo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFONSO, S & LEAL, S. 1995. Tópicos básicos para criação e manutenção de um cepário de microalgas. São Paulo. UNESP, p.17.
- BARBIERI JR & OSTRENSKY, N. 2001. **Camarões Marinhos: reprodução, Maturação e Larvicultura**. Viçosa: ed. Aprenda Fácil, p.255.
- BARREIROS, A.L.B.S; DAVID, J.M; DAVID, J.P. 2006. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quim. Nova**, v.29, p.113-123.
- BARRETO, O.J.S & CAVALCANTI, D.G. 1997. Enriquecimento de alimentos vivos para alimentação de larvas de organismos marinhos: uma breve revisão. **Boletim do Ins. De Pesca**, v.24, p.199-159.
- BELETTINI, F; DERNER, R.B; VINATEA, L.A. 2011. Utilização das microalgas *Thalassiosira weissflogii* E *Nannochloropsis oculata* no cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistemas de berçários, sem renovação de água. **Atlântica**, v.33, p.101-114.
- BONECKER, A.C.T; BONEKER, A.L.C; BASSANI, C. 2002. O plâncton mainho. In: PEREIRA, R.G; SOARES-GOMES, A. (orgs.) *Biologia Marinha*, **Interciencia**: p.103-125.
- BORGES, L; MORÓN-VILLARREYES, J.A; D'OCA, M.G; ABREU, P.C. 2011. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p.4449-4454

- BOROWITZA, M.A. 1999. Commercial production of microalgae: Ponds, tanks, tubes and fermenters. **J. Biotechnol.**, v.7, p.313-321, 1999.
- BRIGGS, M; FUNGE-SMITH, S; SUBASINGHE, R; PHILLIPS, M. 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. RAP publication, v.10, p.92.
- BROWN, M.R; JEFFREY, S.W; VOLKMAN, J.K; DUNSTAN, G.A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v.151, p.315-331.
- BROWN, M.R. 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. **Mar. Res.**, p.281-292.
- BROWN, M.R; GARLAND, C.D; JEFFREY, S.W; JAMESON, I.D; LEROI, J.M. 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. **J Appl. Phycol.**, v.5, p.285-296.
- CAMARGO, S.G.O & POUEY, J.L.O.F. 2005. Aquicultura - um mercado em expansão. **Rev. Bras. Agroc.**, v.11, p.393-396.
- CERENIUS, L.; KAWABATA, S.; LEE, B.L.; NONAKA, M.; SÖDERHÄLL, K. 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. **Trends Biochem Sci**, 35: 575-583.
- CHEVION, S; ROBERTS, M.A; CHEVION, M. 2010. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. **Free Rad. Biol. Med.**, v.28, p.860-870.
- CHOOCHOTE, W; SUKLAMPO, L; OCHAIKUL, D. 2014. Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. **J. Appl. Phycol.** v.26, p.43-48.
- COBO, M.L; WILLE S.S.M; SORGELOOS, P. 2012. Ammonia tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) larvae. **Aquac. Res.** p.1-6.
- COUTTEAU, P. & SORGELOOS, P. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: An international survey. **J. Shellfish Res.** v.11, p.467-476.

- CUI, Y; REN, X; LI, J; ZHAI, Q; FENG, Y; XU, Y. 2017. Effects of ammonia-N stress on metabolic and immune function via the neuroendocrine system in *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellf. Immunol.** v.64, p.270–275.
- DANTAS, D; NETO, J.P; OLIVEIRA, A; PEIXOTO, S; SOARES, R. 2007. Crescimento de *Thalassiosira fluviatilis*, *Chaetoceros muelleri* e *Navícula sp.* em diferentes protocolos de fertilização. In: IV - FENACAM - Feira Nacional do Camarão, Natal. **Apresentação de Trabalhos Técnicos**, p.14-15.
- DECAMP, O; MORIARTY, D.J.W; LAVENS, P. 2008. Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. **Aquac. Res.** v.39, p.334-338.
- DERNER, R.B. 2006. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poli-insaturados. Teses UFSC, Florianópolis, SC.
- D'SOUZA, F.M.L; KNUCKEY1, R.M; HOHMANN, S; PENDREY, R.C. 2002. Flocculated microalgae concentrates as diets for larvae of the tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquac. Nutr.** v.8, p.113-120.
- DUERR, E.O; MOLNAR, A; SATO, V. 1998. Cultured microalgae as aquaculture feed. **J. Biotechnol.** v.7, p.65-70.
- EMMERSON, W.D. 1980. Ingestion, growth and development of *Penaeus indicus* larvae as a function of *Thalassiosira weissflogii* cell concentration. **Mar. Biol.**, v.58, p.65-73.
- FAO. 2004. Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en America Latina. Roma: **Documento Tecnico de Pesca**, p.450.
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Roma. p.231.
- GEETHA, B.V; NAVASAKTHI, R; PADMINI, E. 2010. Investigation of antioxidant capacity and phytochemical composition of Sun *Chlorella* - an *in vitro* study. **J Aquac Res Develop.**v.1, p.104.

- GOH S.H.; YUSOFF, F.M.; LOH, S.P. 2010. A comparison of the antioxidante properties and total phenolic content in a diatom, *Chaetoceros* sp. and a green microalga, *Nannochloropsis* sp. **J. Agr. Sci.** v.2, p.123–130.
- GOIRIS, K; MUYLAERT, K; FRAEYE, I; FOUBERT, I; DE- BRABANTER, J; DE-COOMAN, L. 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid contente. **J. Appl. Phycol.** v.24, p.477–1486.
- GÓMEZ, A.L; LÓPEZ, J.A; RODRÍGUEZ, A; FORTIZ, J; MARTÍNEZ, L.R; APOLINAR, A; ENRÍQUEZ, L.F. 2016. Producción de compuestos fenólicos por cuatro especies de microalgas marinas sometidas a diferentes condiciones de iluminación. **Lat. Am. J. Aquat. Res.** v.44, p.137-143.
- GOUVEIA, L; NOBRE, B.P; MARCELO, F.M; MREJEN, S; CARDOSO, M.T; PALAVRA, A.F; MENDES, R.L. 2007. Functional food oil colored by pigments extracted from microalgae with supercritical CO<sub>2</sub>. **Food Chem.** v.101, p.717–723.
- GUEDES, A & MALCATA, F.X. 2012. Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture, Aquaculture, Dr. Zainal Muchlisin (Ed.) ISBN: 978-953-307-974-5, InTech, Available form: <https://www.intechopen.com/books/aquaculture/nutritional-value-and-uses-of-microalgae-in-aquaculture>
- GUILLARD, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. **Culture of marine invertebrates animals**, p.29-60.
- HAJIMAHMOODI, M.; FARAMARZI, M.A.; MOHAMMADI, N.; SOLTANI, N.; OVEISI, M.R.; NAFISSI-VARCHEH, N. 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **J. Appl. Phycol.** v.22, p.43–50.
- HALLIWELL, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol.** v.141, p.312–322.
- HALLIWELL, B. 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? **Arch. Biochem. Biophys.** v.476, p.107-112.

- HEASMAN, M; DIEMAR, J; O'CONNOR, W; SUSHAMES, T; FOULKES, L. 2000. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs – a summary. **Aquac. Res.** v.31, p.637-659.
- HWANG, D.F; LIN, T.S. 2002. Effects of temperature on dietary vitamin C requirement and lipid in common carp. **Comp. Biochem. Physiol.** v.131, p.1–7
- JONES, D.A; KUMLU, M; LE VAY, L , FLETCHER, D.J. 1997a. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: A review. **Aquaculture** v.155, p.285-295.
- JONES, D.A; YULE, A.B; HOLANDA, D.L. 1997b. Larval nutrition. In: **Crustacean Nutrition** (eds D'ABRAMO, L.R; CONKLIN, D.E; AKIYAMA, D.M), p.353-389. The World Aquaculture Society, v.6, Baton Rouge, LA, USA.
- JU, Z.Y; FORSTER, I.P; DOMINY, W.G. 2009. Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v.292, p.237-243
- KIM, J; ARK, Y; CHOI, K. 2009. Phototoxicity and oxidative stress responses in *Daphnia magna* under exposure to sulfathiazole and environmental level ultraviolet B irradiation. **Aquat. Toxicol.** v. 91, p.87–94.
- KITANI, H. 1986. Larval development of the white shrimp *Penaeus vannamei* BOONE reared in the laboratory and the statistical observation of its naupliar stages. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** v.52, p.1131-1139
- KLEJDUS, B.; LOJKOVÁ, L.; PLAZA, M.; SNÓBLOVÁ, M.; STĚRBOVÁ, D. 2010. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr.** v.1217, p.7956–7965.
- KRUMMENAUER, D, RO CAVALLI, LH POERSCH & W WASIELESKY. 2011. Superintensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc technology system in southern Brazil at different stocking densities. **J. World Aquacult. Soc.** v.42, p.726–733.

- KUMLU, M. 1999. Feeding and digestion in larval decapod crustaceans. **Tr. J. Biol.** v.23, p.215-229
- LAVENS, P & SORGELOOS, P. 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. **Aquaculture** v181, p.397-403.
- LeBEL, C.P; ISCHIROPOULOS, H; BONDYS, S.C. 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.** v.5, p. 227-231.
- LI, H.; CHENG, K.; WONG, C.; FAN, K.; CHEN, F.; JIANG, Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chem.** v.102, p.771–776.
- LOBATO, R.O, MANSKE, S.N; WASIELESKY, W; FATTORINI, D; REGOLI, F; MONSERRAT, J.M; VENTURA-LIMA, J. 2013. The role of lipoic acid in the protection against of metallic pollutant effects in the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol. Part A**, v.165, p. 491-497.
- LÓPEZ-MARTÍNEZ, J; VÁZQUEZ, H.S; VALDIVIA, H.E; RODRÍGUEZ, R.J.; CHÁVEZ, E.A. 2008. Influencia ambiental en la pesquería del camarón. In: López, M.J. (Ed.), Variabilidad Ambiental y pesquerías de México. SAGARPA, CIB, México, pp. 114–127.
- LOURENÇO, S.O. 1996. Variação da composição bioquímica de microalgas marinhas em cultivos com Ênfase nos efeitos da disponibilidade do elemento nitrogênio. Tese de Doutorado, USP, 164p.
- LOURENÇO, S.O; MARQUEZ, U.M.L; MANCINI-FILHO, J; BARBARINO, E; AIDAR, E. 1997. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Crison of two culture media. **Aquaculture** v.148, p.153-158.
- MACIAS-SANCHO, J; POERSCH, L.H; BAUER, W; ROMANO, L.A; WASIELESKY, W; TESSER, M.B. 2014. Fishmeal substitution with *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: Effects on growth and immunological parameters. **Aquaculture** v.426–427, p.120–125.

- MALLICK, N & MOHN, F.H. 2000. Reactive oxygen species: Response of algal cells. **J. Plant Physiol.** v.157, p.183-193.
- MARCHIORI, M.A. 1996. Guia ilustrado de maturação e larvicultura do camarão-rosa *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante 1997. Ed. FURG, Rio Grande.
- MARTINS, T.G; CAVALLI, R.O; MARTINO, R.C; REZENDE, C.E.M; WASIELESKY Jr. 2006. Larviculture output and stress tolerance of *Farfantepeneaus paulensis* postlarvae fed *Artemia* containing different fatty acids. **Aquaculture**, v.252, p.525– 533.
- MOSS, K & MOSS, S. 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific white shrimps *Litopenaeus vannamei*. **J. World Aquac. Soc.** v.4, p.536-542.
- MOURA, S.A.L. 2009. Estudo dos efeitos do extrato de própolis em um modelo murino de angiogênese inflamatória. Tese de Doutorado, UFMG.
- OLIVEIRA, C & RUBIO, J. 2011. Mecanismos, Técnicas e Aplicações da agregação no tratamento mineral e ambiental. Rio de Janeiro, CETEM/MCT.
- ORTEGA-VILLASANTE, C; BURÉN, S; BARÓN-SOLA, A; MARTÍNEZ, F; HERNÁNDEZ, L.E. 2016. *In vivo* ROS and redox potential fluorescent detection in plants: Present approaches and future perspectives. **Methods**. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.07.009>
- PALACIOS, E & RACOTTA, I.S. 2007. Salinity stress test and its relation to future performance and different physiological responses in shrimp postlarvae. **Aquaculture** v.268, p.123-135.
- PANGASTUTI, A; SUWANTO, A; LESTARI, Y; SUHARTONO M.T. 2010. Bacterial communities associated with white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae at early developmental stages. **Biodiversitas** v.11, p.65–68.
- PEIXOTO, H; ROXO, M; KRSTIN, S; ROHRIG, T; RICHLING, E; WINK, W. 2016. An anthocyanin-rich extract of acai (*Euterpe precatória* Mart.) increases stress resistance and retards aging-related markers in *Caenorhabditis elegans*. **J. Agric. Chem.** v.64, p.1283-1290.

- PIETTA, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.** v.63, p.1035–1042.
- PONIS, E; ROBERT, R; PARISI, G. 2003. Nutritional value os fresh concentrated algae diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassotrea gigas*). **Aquaculture** v.221, p.491-505.
- QUACKENBUSH, L. S. 1991. Regulation of vitellogenesis in penaeid shrimp. *In*: DELOACH, P; DOUGHERTY, W.K; DAVIDSON, M.J (eds.), **Frontiers in Shrimp Research**, p.125–140.
- RACOTTA, I.S; PALÁCIOS, E; HERNÁNDEZ-HERRERA, R; BONILLA, A; PÉREZ-ROSTRO, C.I; RAMÍREZ, J.L.. 2004. Criteria for assessing larval and postlarval quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture** v.233, p.181–195.
- RADHAKRISHNAN, S.; SARAVANA, P.B.; SEENIVASAN, C.; SHANTHI, R.; MURALISANKAR, T. 2014. Replacement of fishmeal with *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* on non-enzymatic and enzymatic antioxidant activities of *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Basic Appl. Zool.** v.67, p.25-33.
- ROBBINS, R.J. 2003. Phenolic acids in food: an overview of analytical methodology. **J. Agr. Food Chem.**, v.51, p.2866-2887.
- RODRIGUEZ, A; LE VAY, L; MOURENTE, G; JONES, D.A. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme activity in larvae and postlarvae of *Penaeus japonicus* during herbivorous and carnivorous feeding. **Mar. Biol.**, v.118, p.45-51.
- ROSELET, F; VANDAMME, D; ROSELET, M; MUYLAERT, K; ABREU, P.C. 2015. Screening of commercial natural and synthetic cationic polymers for flocculation of freshwater and marine microalgae and effects of molecular weight and charge density. **Algal Res.** v.10, p.183–188.
- SALES, R; MÉLO, R.C; MORAES-JUNIOR, R.M; DA SILVA, R.C.S; CAVALLI, R.O; NAVARRO, D.M.A.F; SANTOS, L.P.S. 2016. Production and use of a flocculated paste of *Nannochloropsis oculata* for rearing newborn seahorse *Hippocampus reidi*. **Alg. Res.** v.17, p.142-149.

- SAMOCHA, T.M; UZIEL, N; BROWDY, C.L. 1989. The effect of feeding two prey organisms, nauplii of *Artemia* and rotifers, *Brachionus plicatilis* upon survival and growth of larval marine shrimp, *Penaeus semisulcatus*, **Aquaculture** v.77, p.11-19.
- SANUDIN, N.; TUZAN, A.D.; YONG, A.S.K. 2014. Feeding activity and growth performance of shrimp post larvae *Litopenaeus vannamei* under light and dark condition. **J. Agric. Sci.** v.6, p.103–109.
- SHANAB, S.M.M; MOSTAFA, S.S.M.; SHALABY, E.A. 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific J. Trop. Biomed.** v.2, p.608-615.
- SILVA, B.C; ANDRE, R.C; BELETTINI, F; BUGLIONE, C.C; JATOBÁ, A; VIEIRA, F.N; ANDREATTA, E.R; DERNER, R.B.; MOURIÑO1, J.L. 2009. Utilização de *Thalassiosira weissflogii* em larvicultura DE *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931). **Atlântica**, v.21, p.39-50.
- SILVA, C.F; BALLESTER, E.L.C; MONSERRAT, J; GERACITANO, L; WASIELESKY, W, ABREU, P.C. 2008. Contribution of microorganisms to the biofilm nutrition quality: protein and lipid contents. **Aquac. Nutr.** v.14, p.507-514.
- SIRVAS-CORNEJO, S.; LATCHFORD, J.W.; JONES, D.A. 2007. Effect of microencapsulated diets supplemented with genetically modified bacteria on the growth and survival of *Fenneropenaeus indicus* postlarvae. **Aquac. Nutr.**, v.13, p.10–16.
- SOUZA, D.M; BORGES, V.D; FURTADO, P; ROMANO, LA; WASIELESKY, W; MONSERRAT, J.M; GARCIA, L.O. 2016. Antioxidant enzyme activities and immunological system analysis of *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc technology (BFT) at different water temperatures, **Aquaculture** v.451, P.436–443.
- STRICKLAND, J.D.H & PARSONS, T.R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. **Fish Res.Board**, p.310.
- SUBUNTITH, N.; PHATTANUNT, T.; KALLAYA, S.; TRAIMAT, B.; VERAPONG, V. 2011. Enhancement of growth performance, digestive enzyme activities and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) postlarvae by potential probiotics. **Aquac. Int.** v.21, p.655–666.

- SUITA, S.M; ROMANO, L.A; CARDOZO, A.P; ABREU P.C; WASIELESKY, W. 2015. Development of the hepatopancreas and quality analysis of postlarvae Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* produced in a BFT system. **Aquac. Int.**, v.23, p.449-463.
- SUITA, S.M; BRAGA, A; BALLESTER, E; CARDOZO, A.P; ABREU P.C; WASIELESKY, W. 2016. Contribution of bioflocs to the culture of *Litopenaeus vannamei* post-larvae determined using stable isotopes. **Aquac. Int.** v.24, p.1473-1487.
- SUZUKI, N; KOUSSEVITZKY, S; MITTLER, R; MILLER, G. 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. **Plant Cell Environ.** v.35, p.259–270.
- TEIXEIRA, V.L. 2002. Produtos naturais marinhos. In: PEREIRA, R.G; SOARES-GOMES, A. **Biología Marinha**, p.249-279. TEIXEIRA, A.P. & GUERRELHAS, A.C.B. 2011. Cultivo intensivo: pode ser a solução para o aumento da produção da carcinicultura. **Panorama da Aquicultura** v.21, p.52-57.
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. **Intergovernmental Oceanographic Commission**, p.53.
- WANG, F.I. & CHEN. J.C. 2006. The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela* under temperature stress. **Aquaculture** v.258, p.34-41.
- XIE, F; KOZIAR, S.A; LAMPI, M.A; DIXON, D.G; NORWOOD, W.P; BORGMANN, U; HUANG, X.D; GREENBERG, B.M. 2006. Assessment of the toxicity of mixtures of copper, 9,10-phenanthrenequinone, and phenanthrene to *Daphnia magna*: Evidence for a reactive oxygen mechanism. **Environ. Toxicol. Chem.** v.25, p.613–622.
- ZHOU, W.N; WANG, A.L; WANG, W.I; HE, Q.T; ZHOU, Y; LIU. 2009. Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and regulation under pH stress. **Comp. Biochem. Physiol.** v.150, p.224–230.