



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

JAMILLY SOUSA ROCHA

**Caracterização da composição da *Ulva ohnoi* cultivada em bioflocos e seu uso  
como aditivo alimentar para o camarão-branco-do-pacífico**

Florianópolis  
2023

Jamilly Sousa Rocha

**Caracterização da composição da *Ulva ohnoi* cultivada em bioflocos e seu uso como aditivo alimentar para o camarão-branco-do-pacífico**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutora em Aquicultura

Orientador: Prof. Felipe do Nascimento Vieira, Dr.

Florianópolis  
2023

[Digite texto]

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

Rocha, Jamilly Sousa

Caracterização da composição da *Ulva ohnoi* cultivada em bioflocos e seu uso como aditivo alimentar para o camarão branco-do-pacífico / Jamilly Sousa Rocha ; orientador, Felipe do Nascimento Vieira, 2023.

61 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. alga verde. 3. composição bioquímica. 4. efluente de camarões. 5. *Litopenaeus vannamei*. I. Vieira, Felipe do Nascimento . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Jamilly Sousa Rocha

**Caracterização da composição da *Ulva ohnoi* cultivada em bioflocos e seu uso como aditivo alimentar para o camarão-branco-do-pacífico**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado, em 29 de agosto de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Felipe do Nascimento Vieira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Delano Dias Schleder, Dr.  
Instituto Federal Catarinense

Prof. Frank Belettini Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Gabriele Rodrigues de Lara, Dra.  
Pontificia Universidad Católica de Valparaiso - Chile

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

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Felipe do Nascimento Vieira, Dr.

Florianópolis, 2023

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por encerrar esse ciclo da minha vida.

Ao meu filho por ser a minha força diária.

A minha família por sempre estar presente e me apoiando.

Ao meu quarteto fantástico do LCM (Daniele, Camilla, Flávia e Isabela) pelo companheirismo.

Ao meu orientador por toda atenção e aprendizado.

A todos do Laboratório de Camarões Marinhos que contribuíram de alguma forma nesses anos.

E a minha turma de doutorado por todo coleguismo.

Não há sensação melhor do que dever cumprido, minha eterna gratidão a essas pessoas que me deram a mão e me ajudaram a evoluir profissionalmente e pessoalmente.



*“A persistência é o caminho do êxito.”* (Charles Chaplin)



## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a macroalga *Ulva ohnoi* cultivada em bioflocos e seu efeito em diferentes concentrações na dieta do *Litopenaeus vannamei*. Para isso foram realizados dois experimentos, sendo que no primeiro foram avaliadas as alterações no desempenho algal, compostos bioativos da macroalga, produção de ulvana e concentração proteica antes e após o cultivo em sistema de bioflocos. Durante 28 dias, as macroalgas foram cultivadas em 3 unidades experimentais com efluentes de camarões proveniente de um tanque matriz de bioflocos, contendo aeração constante e aquecedor, com densidade de 6 g L<sup>-1</sup>. No segundo experimento foi avaliado o efeito da *U. ohnoi* cultivada em bioflocos na dieta do camarão sobre o desempenho zootécnico, parâmetros hemato-imunológicos, microbiota intestinal (bactérias totais e *Vibrio* spp. totais), desafio com o *Vibrio parahaemolyticus* e resistência ao choque térmico. Durante 6 semanas os animais foram alimentados com dietas experimentais, onde a *U. ohnoi* foi adicionada com níveis de 0,5%, 1% e 2% em substituição ao caulim, enquanto a dieta controle apresentou a mesma composição de ingredientes sem adição da alga. No primeiro experimento as algas tiveram um aumento de 49,5 g de biomassa semanal. As diferenças estatísticas foram encontradas no rendimento da ulvana inicial 2,64±0,3 % e final 4,62±0,2%, e um incremento de 30,2% na concentração proteica no final do cultivo. Um aumento na concentração de flavonoides foi observado nos dias 7 e 14 (0,41±0,04; e 0,41±0,07 µg g<sup>-1</sup> de peso seco), e os carotenoides diminuíram aproximadamente 41,3% nas macroalgas no final do cultivo. No segundo experimento não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para os parâmetros zootécnicos, imunológicos, quantificação de bactérias heterotróficas totais e vibrionáceas dos camarões, desafio com o *Vibrio* e a mortalidade após choque térmico agudo. Em conclusão, a *U. ohnoi* pode ser cultivada em bioflocos, melhorando a produtividade da ulvana e concentração proteica. O nível de inclusão da macroalga na dieta do camarão não interferiu nos resultados entre os tratamentos.

**Palavras-chave:** Aquicultura, alga verde, composição bioquímica, efluente de camarões, *Litopenaeus vannamei*.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the macroalgae *Ulva ohnoi* grown in biofloc and its effect in different concentrations in the diet of *Litopenaeus vannamei*. For this, two experiments were carried out, and in the first were evaluated the changes in algal performance, bioactive compounds of macroalgae, production of ulvana and protein concentration before and after cultivation in bioflake system. During 28 days, the macroalgae were cultivated in 3 experimental units with shrimp effluents from a matrix tank of bioflakes, containing constant aeking and heater, with a density of 6 g L<sup>-1</sup>. In the second experiment, the effect of *U. ohnoi* cultivated in bioflakes in shrimp diet on zootechnical performance, hematoimmunological parameters, intestinal microbiota (total bacteria and total *Vibrio* spp.), challenge with *Vibrio parahaemolyticus* and resistance to thermal shock was evaluated. For 6 weeks the animals were fed experimental diets, where *U. ohnoi* was added with levels of 0.5%, 1% and 2% in place of kaolin, while the control diet was the same composition of ingredients without seaweed addition. In the first experiment the algae had an increase of 49.5 g of weekly biomass. Statistical differences were found in the yield of the initial ulvana 2.64±0.3% and final 4.62±0.2%, and an increase of 30.2% in protein concentration at the end of cultivation. An increase in flavonoid concentration was observed on days 7 and 14 (0.41±0.04; and 0.41±0.07 µg g<sup>-1</sup> dry weight), and carotenoids decreased approximately 41.3% in macroalgae at the end of cultivation. In the second experiment, no significant differences were observed between treatments for zootechnical, immunological parameters, quantification of total heterotrophic bacteria and shrimp vibriaceous bacteria, challenge with *Vibrio* and mortality after acute thermal shock. In conclusion, *U. ohnoi* can be grown in bioflakes, improving ulvan productivity and protein concentration. The level of inclusion of macroalgae in the shrimp diet was not interfere in the results between treatments.

**Keywords:** Aquaculture, green seaweed, biochemical composition, shrimp effluent, *Litopenaeus vannamei*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
1.1	Macroalgas.....	15
1.1.1	Gênero <i>Ulva</i> .....	15
1.2	Aplicações das macroalgas.....	18
1.2.1	Utilização das macroalgas na aquicultura.....	18
1.3	OBJETIVOS.....	20
1.3.1	Objetivo geral.....	20
1.3.2	Objetivos Específicos.....	20
1.4	FORMATAÇÃO DO TRABALHO.....	21
<b>2</b>	<b>ARTIGO 1- Sea lettuce (<i>Ulva ohnoi</i>) cultivation in biofloc technology: growth performance and characterization of bioactive compounds.....</b>	<b>22</b>
2.1	Introduction.....	24
2.2	MATERIAL AND METHODS.....	26
	<i>Macroalgae</i> .....	26
	<i>Experimental Design</i> .....	26
	<i>Ulva ohnoi dry weight</i> .....	27
	<i>Extraction and quantification of total phenolic compounds and photosynthetic pigments</i> .....	27
	<i>Extraction and quantification of total flavonoids</i> .....	28
	<i>Ulvan extraction</i> .....	28
	<i>Protein content</i> .....	29
	<i>Statistical analysis</i> .....	29
2.3	RESULTADOS.....	30
	<i>Water quality</i> .....	30
	<i>Algal growth performance and characterization of biocompounds</i> .....	31
2.4	DISCUSSION.....	34
2.5	CONCLUSION.....	38
2.6	REFERENCES.....	38
<b>3</b>	<b>ARTIGO 2- <i>Ulva ohnoi</i> cultivada em bioflocos utilizada como aditivo alimentar para o camarão-branco-do-pacífico.....</b>	<b>45</b>
3.1	INTRODUÇÃO.....	48
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
	<i>Animais experimentais</i> .....	49

<i>Biomassa seca das macroalgas</i> .....	49
<i>Produção e composição química das dietas</i> .....	50
<i>Delineamento e condições experimentais</i> .....	51
<i>Avaliação dos parâmetros zootécnicos</i> .....	51
<i>Análise de parâmetros hemato-imunológicos</i> .....	52
<i>Análise da microbiota do trato intestinal</i> .....	53
<i>Desafio experimental com Vibrio parahaemolyticus</i> .....	53
<i>Choque térmico</i> .....	53
<i>Análises estatísticas</i> .....	53
<b>3.3 RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
<i>Parâmetros da qualidade de água</i> .....	54
<i>Parâmetros zootécnico</i> .....	54
<i>Parâmetros hemato-imunológicos</i> .....	55
<i>Contagem bacteriológica do trato intestinal</i> .....	55
<i>Desafio experimental com Vibrio parahaemolyticus</i> .....	56
<i>Choque térmico</i> .....	57
<b>3.4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>3.5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>3.6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>60</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>66</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 MACROALGAS

Aproximadamente 70% da biosfera é ocupada por biomas marinhos, os quais detêm uma ampla diversidade taxonômica e bioquímica, sendo importantes fontes de metabolitos bioativos (HOLDT; KRAAN, 2011). Dentro do bioma marinho, encontramos as macroalgas que são classificadas em três grandes grupos: algas marrons ou pardas (Phaeophyta), algas vermelhas (Rhodophyta), e algas verdes (Chlorophyta) (GARSON, 1989; GRAHAM et al., 2008; MENDEZ, 2002; McHUGH, 2003). Estes grupos são baseados em termos biológicos de acordo com a presença de pigmentos específicos (clorofilas, carotenoides) que estão relacionados com a sua distribuição no ambiente e a disponibilidade de luminosidade para realizar a fotossíntese (MARINHO-SORIANO & CARNEIRO, 2021). As algas (organismos fotossintetizantes), encontram-se distribuídas em diferentes profundidades ou zonas determinadas pela luz disponível. De um modo geral, as verdes estão mais próximas da costa, apresentando uma maior quantidade quando comparada com os demais grupos. Este grupo de algas verdes (Chlorophyta) são divididas em cinco classes: Prasinophyceae, Pedinophyceae, Ulvophyceae, Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, sendo considerado o grupo de algas mais diversificado, apresentando cerca de 7000 espécies (ALGAS VERDES, 2012).

As macroalgas marinhas são vegetais aquáticos autotróficos e bentônicos em sua maioria, sem vascularização, cujo corpo é representado por um talo. São organismos multicelulares, suas características se diferem de acordo com seus compostos, fisiologia, além da diferença de conteúdo de teor proteico, fibras e minerais (GRAHAM *et al.*, 2008). São ricas em vitaminas A, B1, B12, C, D e E, riboflavina, niacina, ácidos pantotênico, fólico e minerais (HOLDT; KRAAN, 2011; VASCONCELOS; GONCALVES, 2013), macronutrientes (proteínas, lipídios e hidratos de carbono), e em minerais (sódio, cálcio, magnésio, potássio, cloro, enxofre, fósforo, iodo, ferro, zinco, cobre, selênio, molibdênio, fluoreto, magnésio, boro, níquel e cobalto) (FAO, 2018a).

### 1.1.1 Gênero *Ulva*

Em 1753, o gênero *Ulva* foi descrito por Linnaeus. Este gênero é formado taxonomicamente por um grupo de 130 espécies (GUIRY; GUIRY, 2019). São dependentes de luminosidade intensa, habitam zonas de entremarés, são encontradas fixadas ao substrato e livres e flutuantes nas correntes marinhas (MELTON *et al.*, 2016a; GUIRY; GUIRY, 2019).

Geralmente as espécies de *Ulva* formam aglomerados densos, preenchendo as zonas mais abrigadas e ensolaradas de poças e recessos costeiros. São predominantes em ambientes que possuem alta concentração de nitrogênio e fósforo, como por exemplo, estuários e lagunas costeiras (LANARI; COPERTINO, 2017; NETTO *et al.*, 2018). Apresentam características como, texturas finas e sedosas, com margens cerosas frequentemente onduladas, a espessura das lâminas em geral é formada por apenas duas camadas de células (HAYDEN *et al.*, 2003). Apesar deste gênero ser facilmente reconhecido, apresenta um alto nível de variação morfológica intraespecífica (BRODIE *et al.*, 2008).

Os compostos sulfatados encontrados nas algas apresentam propriedades bioativas, contribuindo assim para a importância econômica desses organismos (MAGALLANES; CÓRDOVA; OROZCO, 2003). Os polissacarídeos sulfatados possuem propriedades antibacterianas, e antivirais (AIRAPPAN, 2003). Ivanova *et al.* (1994) observaram atividade antiviral contra o vírus influenza em humanos e aves, a partir do isolamento de um polissacarídeo de *U. lactuca*. Um dos principais polissacarídeos deste gênero é a ulvana, uma fibra solúvel, componente significativo da parede da alga, que constitui entre 8 e 29% do peso seco de *Ulva* a depender da espécie e crescimento (ROBIC *et al.*, 2009). Este polissacarídeo apresenta atividade antiviral, anticoagulante, anti-hiperlipidêmica e anticancerígena, além de efeitos imunestimulatórios (ALVES *et al.*, 2013; LAHAYE; ROBIC, 2007). A ulvana influencia o sistema imunológico em algumas espécies de peixes e apresentam constituintes tipo sulfatos, metil com propriedades antioxidantes (FERNÁNDEZ-DAÍZ *et al.*, 2017).

Figura 1: Polissacarídeo ulvana extraído da *Ulva ohnoi*

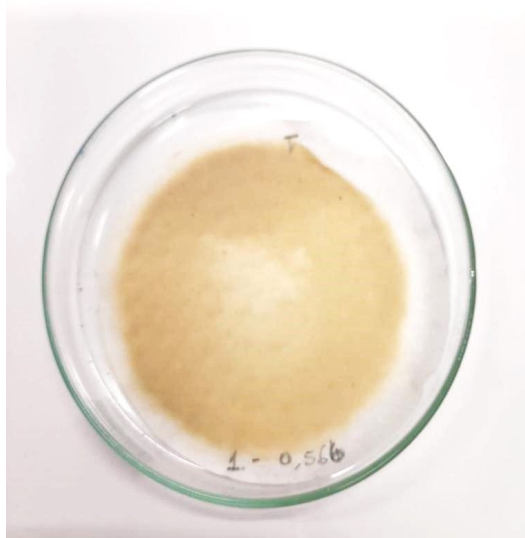


Foto: Jamilly Sousa Rocha

A clorofila é o pigmento principal encontrado nas algas marinhas e está envolvido na captação de energia luminosa. Os carotenoides são considerados pigmentos acessórios que auxiliam como coadjuvantes no processo de fotossíntese ajudando a proteger os tecidos contra danos causados pela luz solar (LOBBAN; HARRISON, 1997a). Os carotenoides juntamente com as vitaminas lipossolúveis, estão associados a diversos processos metabólicos devido ao seu poder antioxidante (SOLTANI *et al.*, 2011).

Figura 2: Talo selvagem de *Ulva ohnoi*



Foto: Jamilly Sousa Rocha

*U. ohnoi* (HIRAOKA; SHIMADA, 2004), é amplamente distribuída em torno da América do Norte, Coreia do Sul, Japão e Mar Mediterrâneo. A temperatura ideal para crescimento está entre 20-25 °C, podendo gradualmente se espalhar para altas latitudes à medida que as temperaturas da água do mar aumentam (LARGO *et al.*, 2004). É considerada uma espécie invasora e oportunista, ocorre em mares tropicais e temperados em todo o mundo (CHÁVEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2019; MILADI *et al.*, 2018). No Brasil, foi primeiramente registrada na região Nordeste, em Fernando de Noronha (PE) por Batista (2018). Seu ciclo de vida é isomórfico e diplohaplônico, com rápida taxa de crescimento (HIRAOKA, 2022).

As florações e acúmulos de algas (Ulvophyceae) são geralmente chamadas de "marés verdes". O aumento da temperatura da superfície do mar e dos sais nutritivos devido ao aquecimento global favorecem a reprodução em massa de *U. ohnoi* (KANG *et al.*, 2021).

Cerca de 700 toneladas de *U. ohnoi* foram coletadas em área de floração no Japão e parte dessa biomassa de algas foi utilizada como ingrediente alimentar (OHNO, 1999). Esta alga contém uma grande quantidade de polissacarídeos, que tem sido relatado pelos seus efeitos antivirais, aumento da imunidade e anticancerígenos (RYU *et al.*, 1982).

## 1.2 APLICAÇÕES DAS MACROALGAS

Historicamente, as algas vêm sendo utilizadas desde 600 a.C. pelas populações costeiras como alimentação humana e fins medicinais, principalmente nos países do Oriente (BUSCHMANN *et al.*, 2017; FLUERENCE, 1999). A China, o Japão e a República da Coreia, estão entre os principais consumidores de algas (frescas e desidratadas), sendo utilizadas para produção de medicamentos, ficocoloides e aditivos alimentares (MABEAU; FLEURENCE, 1993; MCHUGH, 2003). Com o passar dos anos, diversas aplicações foram desenvolvidas com o uso de macroalgas. No Brasil, a diversidade é grande e as pesquisas com relação às macroalgas tem se desenvolvido com resultados surpreendentes.

O algocultura é uma indústria em crescimento, em 2020 foram produzidas mais de 30 milhões de toneladas de macroalgas (peso fresco) (FAO, 2022). Além das diversas aplicações na indústria (cosméticos, fertilizantes, produção de biodiesel, tratamento de efluentes, etc), as algas marinhas apresentam benefícios para a saúde humana e animal, devido à grande variedade de compostos benéficos com atividades antioxidantes, antimicrobianas, aplicações do ficocoloides, dentre outras (McHUGH, 2003; OLIVEIRA, 1997; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Estudos revelaram que as algas “*in natura*” ou desidratadas são boas fontes de importantes nutrientes como aminoácidos, vitaminas, minerais (KUMAR *et al.*, 2008; PEÑA-RODRIGUEZ *et al.*, 2011). Esses nutrientes apresentam variações devido aos diferentes fatores abióticos (DENIS *et al.*, 2010).

### 1.2.1 Utilização das macroalgas na aquicultura

Na aquicultura, as macroalgas podem ser utilizadas de forma direta, dentro dos cultivos, ou como fonte de nutrientes em rações para aquicultura (PEIXOTO *et al.*, 2019; VALENTE *et al.*, 2006), sendo os gêneros mais utilizados *Ulva* e *Gracilaria* (SAMOCHA *et al.*, 2015). Para reduzir os impactos ambientais negativos associados à aquicultura, como por exemplo, a produção de efluentes, o acúmulo de resíduos nitrogenados excretados pelas espécies cultivadas na forma de amônia, que é extremamente tóxica aos organismos marinhos (RANDALL; TSUI, 2002; THURSTON; RUSSO, 1983), pesquisadores iniciaram a busca



para esta solução, tendo resultados surpreendentes com a junção do sistema de bioflocos (BFT), aquicultura multitrófica integrada (IMTA) e a inclusão de macroalgas no sistema.

BFT é uma alternativa promissora que favorece a sustentabilidade, biossegurança, gestão na qualidade da água e reciclagem da ração para os cultivos dos animais aquáticos (AVNIMELECH, 1999; BRAGA *et al.* 2016; DEB *et al.*, 2017; NAYLOR *et al.*, 2000). Porém, esse sistema é operado sem troca de água e acaba gerando acúmulo de excretas e resíduos nitrogenados dos animais (EMERENCIANO *et al.*, 2013). Visando solucionar esta problemática, a IMTA vem sendo apontado por melhorar o aproveitamento desses nutrientes (CHOPIN *et al.*, 2001).

IMTA é um sistema que inclui espécies de diferentes níveis tróficos, podendo ser definido como “uma prática em que subprodutos de uma espécie são reciclados para se tornarem insumos para outra” (FAO, 2014). As macroalgas para serem aplicadas nesse sistema devem seguir alguns critérios como: rápido crescimento, facilidade de cultivo e controle do ciclo de vida e acúmulo de altos níveis de nitrogênio (N) e fósforo (P) em suas células e/ou tecidos (NEORI *et al.*, 2004; RABIEI *et al.*, 2014; SAMOCHA *et al.*, 2015). As algas aproveitam as excreções de níveis tróficos dos peixes e crustáceos, transformando o excesso de nutrientes em nova biomassa (CHOPIN *et al.*, 2001; TROELL *et al.*, 2003; NEORI *et al.*, 2004; SHPIGEL *et al.*, 2017). O sucesso da integração dos organismos extrativistas é influenciado de acordo com a gestão do sistema, comportamento alimentar e excreção dos nutrientes dos organismos envolvidos (ROSAS *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2006). As taxas de assimilação dos nutrientes pelas macroalgas melhoram quando a luz está presente, tendo a energia necessária para a absorção dos mesmos através da fotossíntese (HARRISON; HURD, 2001). Além da luz, outros mecanismos ajudam também na assimilação e armazenamento dos nutrientes, como as preferências por diferentes fontes de nitrogênio, movimento da água, temperatura, salinidade, etc (ROLEDA; HURD, 2019). Resultados positivos foram obtidos com as algas *Gracilariopsis bialinae*, *Ulva rigida*, *U. lactuca*, as quais ocasionaram uma redução significativa de nitrogênio na água após a absorção/filtração (EVANS e LANGDON, 2000; NEORI *et al.*, 1996, 1998, 2000, 2003).

O valor nutricional identificado nas macroalgas torna-as particularmente apropriadas para alimentação de animais aquáticos. Diversos estudos têm relatados efeitos benéficos para diversas espécies aquáticas quando alimentadas com dietas contendo macroalgas (SHPIGEL *et al.*, 2017), pois apresentam bom perfil nutricional, e potencial para serem ingredientes alternativos para fontes convencionais de proteína alimentar, além de poderem causar benefícios para a imunidade destes animais (MORAIS *et al.*, 2020; SCHLEDER *et al.*, 2017;

VALENTE *et al.*, 2006). No contexto da aquicultura, os efeitos da inclusão de macroalgas na ração resultaram numa melhor qualidade do produto animal. Porém, apesar de todo potencial apresentado, estudos sobre a diversidade do gênero *Ulva*, principalmente *U. ohnoi*, são escassos na literatura. Um dos principais fatores que ocasiona esta escassez é a dificuldade na identificação da morfologia simples e os poucos caracteres diagnosticados, que podem exibir uma grande variação intra e interespecífica das espécies do gênero. Portanto, se faz necessário expandir o domínio da espécie, desenvolvendo estudos relacionados o uso da macroalga *Ulva* sp. e seus efeitos na utilização em dietas na aquicultura.

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 Objetivo geral

Avaliar as alterações na composição da macroalga *Ulva ohnoi* cultivada em sistema de bioflocos e o potencial do seu uso como aditivo alimentar em dietas para camarões.

#### 1.3.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar as alterações no desempenho algal e bioquímica da macroalga *Ulva ohnoi* antes e após o cultivo em efluente de camarões criados em bioflocos.
- b) Avaliar o efeito da suplementação dietética da *Ulva ohnoi* cultivada em bioflocos em quatro níveis de adição (0%; 0,5%; 1% e 2%) como aditivo alimentar para camarão-branco-do-pacífico sobre:
  - ✓ Desempenho zootécnico;
  - ✓ Parâmetros hemato-imunológico;
  - ✓ Análise da microbiota intestinal (bactérias totais e *Vibrio* spp. totais);
  - ✓ Resistência ao desafio experimental com o *Vibrio parahaemolyticus*;
  - ✓ Resistência ao choque térmico.

#### 1.4 FORMATAÇÃO DO TRABALHO

- ARTIGO 1 - Sea lettuce (*Ulva ohnoi*) cultivation in biofloc technology: growth performance and characterization of bioactive compounds, aceito para publicação na revista Boletim do Instituto de Pesca em 16 de outubro de 2023.
- ARTIGO 2 - *Ulva ohnoi* cultivada em bioflocos utilizada como aditivo alimentar para o camarão-branco-do-pacífico, será submetido ao Journal of Applied Aquaculture.

**2 ARTIGO 1- Sea lettuce (*Ulva ohnoi*) cultivation in biofloc technology: growth performance and characterization of bioactive compounds**

Artigo publicado na revista Boletim do Instituto de Pesca, 2023, 49: e848.

DOI: <https://doi.org/10.20950/1678-2305/bip.2023.49.e848>

Jamilly Sousa Rocha<sup>1\*</sup>, Daniele Santos<sup>1</sup>, Mateus Aranha Martins<sup>1</sup>, Cláudia Marlene Bauer<sup>2</sup>, Marcelo Maraschin<sup>2</sup>, Leila Hayashi<sup>1</sup>, Felipe do Nascimento Vieira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Catarina [<https://ror.org/041akq887>] – Centro de Ciências Agrárias – Departamento de Aquicultura – Laboratório de Camarões Marinhos, Florianópolis (SC), Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina [<https://ror.org/041akq887>] – Centro de Ciências Agrárias – Departamento de Fitotecnia – Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Florianópolis (SC), Brasil

**\*Corresponding author:** [jamillysr@hotmail.com](mailto:jamillysr@hotmail.com)

## Abstract

This work evaluated the biofloc technology cultivation of *Ulva ohnoi* on its growth performance and biocompounds contents. *U. ohnoi* was cultivated under an initial density of 6 g L<sup>-1</sup> for 28 days using water from a biofloc tank which was exchanged daily at a 90% rate. Temperature, salinity, and illuminance were measured daily. Algae growth and their density was adjusted weekly. Results showed an average plant growth of 1.15% day<sup>-1</sup> (49.5 g week<sup>-1</sup>). A significant difference was observed when comparing the initial (2.64±0.3%) and final (4.62±0.2%) ulvan concentration, in addition to a protein increase of 30.2%. No statistical differences were found for concentrations of phenolics and chlorophylls. An increase in flavonoids was observed on days 7 and 14 (0.41±0.04; and 0.41±0.07 µg g<sup>-1</sup> of dry weight), as well as a decrease in carotenoids (41.3%). In conclusion, increases in protein and ulvan were observed after *U. ohnoi* was cultivated in bioflocs.

**Keywords:** BFT; Biocompounds; Macroalgae; Protein; Shrimp effluent; Ulvan.

## 2.1 INTRODUCTION

*Ulva ohnoi* is a seaweed belonging to the genus *Ulva* (Linnaeus, 1753), which has in its composition proteins, vitamins, minerals, amino acids, polyunsaturated fatty acids, and several bioactive compounds, such as photosynthetic and phenolic pigments (Angell et al., 2015). This seaweed offers an attractive source of nutritionally important metabolites, generating a growing interest in the industrial sector, and can be used as a natural source of high-value-added compounds (Bikker et al., 2016) and low-cost organic molecules, such as polysaccharides (Alves et al., 2013).

Among the polysaccharides extracted from green algae, ulvan is a sulfated polysaccharide (Lahaye and Axelos, 1993) present in their cell wall. Ulvan is strongly associated with proteins and is considered a functional ingredient as it has shown positive effects on the immune system of aquatic organisms (Peso-Eharri et al., 2012). Other important biocompounds from algae include pigments, of which chlorophyll is the primary one, being essential in plant metabolism, due to their role in absorbing light energy in photosynthesis. Carotenoids are the secondary or accessory ones, which are synthesized only by algae, plants, and microorganisms (Goodwin, 1962). These compounds have biological functions in these organisms, acting as antioxidants, membrane stabilizers, and accessory pigments in photosynthesis (Guaratini et al., 2009).

It is essential to understand how environmental factors influence macroalgae growth performance and production of biocompounds, in view of their optimization. Nutrient levels, luminosity and water temperature are some of the key points to successful cultivation. Macroalgae can be cultivated in continental areas, open lagoons, ponds, and laboratories (Sebök et al., 2017), presenting ideal characteristics for cultivation in aquaculture, including in Integrated Multitrophic Aquaculture (IMTA) systems. IMTA provides nutrient bioremediation capability (Bolton et al., 2009; Hoang et al., 2016), benefits to co-cultivated organisms, and economic diversification through the production of other value-added aquaculture products (Chopin et al., 2001). Species of the genus *Ulva* are promising in this system, since they present considerable rates of assimilation of nutrients that are used for their growth, such as nitrogen in different forms (ammonia, nitrite, nitrate), for example (Troell et al., 2003).

IMTA and biofloc technology (BFT) have been pointed out by researchers as viable alternatives to traditional systems. BFT is characterized by being an intensive or super-

intensive system with low water exchange and higher biosecurity than other systems, providing nutritional supplementation for the cultured animals through their consumption of microbial flocs (Avnimelech, 2015). However, despite the positive points presented by the biofloc system, there is an increase in the accumulation of feed residues, excreta, and inorganic compounds in the system, since shrimp retain only a small percentage of nutrients (23-39% of nitrogen and 10-35% of phosphorus) (Silva et al., 2013; Thakur and Lin, 2003). The disposal of this effluent rich in inorganic and organic nutrients is still a challenge, as it can negatively impact the environment (Avnimelech, 2015; Avnimelech and Ritvo, 2003; Crab et al., 2007).

Several studies have been carried out to minimize these negative effects caused by the intensification of fed aquaculture. In this sense, the use of macroalgae has shown great potential, since these organisms take advantage of the residual nutrients made available by animal production (Xu et al., 2008a; b). Martins et al. (2020) cultivated two species of macroalgae (*U. ohnoi* and *U. fasciata*) using biofloc effluent from shrimp farming as fertilizer and obtained positive results in growth and nutrient uptake in both species. The integration of *U. fasciata* in the cultivation of shrimp and mullet in a biofloc system retained phosphorus and nitrogen, in addition to increasing the concentration of chlorophyll and carotenoids without affecting the productivity of the ulvan extract (Legarda et al., 2021). According to Khoi and Fotedar (2011), the macroalgae *U. lactuca* increased the rate of conversion of nutrients into total biomass in the integrated systems (shrimps and algae) and removed part of the inorganic nitrogen dissolved in the closed aquaculture recirculation system. This removal is the result of photosynthetic activities that facilitate the absorption of nutrients from effluents, improving the water quality of cropping systems (Nelson et al., 2001).

Cultivating macroalgae using water from biofloc systems introduces distinct environmental conditions compared to natural habitats. These controlled environments offer advantages, such as nutrient enrichment and stable conditions, which may positively influence macroalgae growth and biocompound production (Pedra et al., 2017). However, variations in water quality and light distribution can also present challenges, affecting the quantity and composition of biocompounds in addition to algae biomass production (Revilla-Lovano et al., 2021).

Green macroalgae, besides acting as agents to remove organic and inorganic nitrogen compounds from the aquatic environment, also have a high capacity for absorbing compounds such as ammonia (Cohen and Neori, 1991) and nitrate (Lapointe and Tenore, 1981; Naldi and Viaroli, 2002). In general, macroalgae have shown promising results and aroused economic

interest in several sectors, whether in the form of fresh biomass or algal extracts. For example, in a work carried out by Cruz-Suárez et al. (2010), *U. clathrata* supplementation in shrimp feed provided a positive effect on the growth rate of 60% and decreased the feed conversion rate by up to 45%. In addition, green macroalgae supplementation also improves shrimp immunity (Valente et al., 2006). Given all the benefits mentioned above, discoveries and functionalities in the use of macroalgae have emerged, showing the importance of knowing their biochemical and nutritional characteristics. Still, it is worth mentioning that no work was carried out to analyze possible differences in the characteristics of macroalgae cultivated in biofloc. Therefore, this work evaluated the cultivation of the macroalgae *Ulva ohnoi* on its growth performance and changes in its proximate and biochemical composition after cultivation in a biofloc system.

## 2.2 MATERIAL AND METHODS

### *Macroalgae*

Macroalgae were collected in the sedimentation pond of the Marine Molluscs Laboratory of the Federal University of Santa Catarina (LMM/UFSC), whose water temperature and salinity at the time of collection were 24°C and 30‰ respectively. All biomass was stocked in plastic containers (20 L) with water from the pond and transported to the Macroalgae Section of the Marine Shrimp Laboratory from the Federal University of Santa Catarina (LCM/UFSC). The epiphytes and any material encrusted in the macroalgae were manually removed and were then washed with salt water. After this procedure, the macroalgae were kept for 2 days in a circular polyethylene tank with 500 L, initial temperature of 24°C, and salinity of 32‰. The temperature and salinity were increased gradually until reaching the values that were to be used in the experiment (28°C, 39‰). The tank was equipped with an aeration system with three porous stones.

### *Experimental Design*

Three experimental units were used, consisting of rectangular white polypropylene boxes with a capacity of 60 L (55.5x37.7x31 cm) and a useful volume of 40 L, containing constant aeration and an HT-1900 100W heater. The initial density of macroalgae cultivation was 6 g L<sup>-1</sup> and the cultivation time was 28 days. The water used for the experiment was collected from the LCM biofloc matrix tank (capacity of 40 m<sup>-3</sup>), where 5,000 *Litopenaeus vannamei* shrimp with approximately 15 g were cultured in a biofloc system. Shrimp were fed



4 times a day with commercial feed (Guabi Poti Evolution: 35% crude protein, 7.5% lipids, 4% fiber, 14% mineral matter, 10% moisture) at a rate of 3% of their biomass according to a feeding table (Van Wyk, 1999). Weekly, water quality parameters were evaluated in this tank, which remained constant throughout the experiment: total ammonia nitrogen  $0.11 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ , nitrite-N  $0.09 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$ , pH  $7.69 \pm 0.01$ , dissolved orthophosphate  $4.13 \pm 1.4 \text{ mg L}^{-1}$ , total suspended solids  $544 \pm 42.8 \text{ mg L}^{-1}$ , alkalinity  $188 \pm 10.5 \text{ mg L}^{-1}$  and nitrate-N  $57.1 \pm 16.7 \text{ mg L}^{-1}$ . All parameters were within the recommended range for the shrimp (Van Wyk and Scarpa 1999).

The water exchange of the experimental units was performed once a day (morning), throughout the experiment, at a rate of 90% of the useful volume of the box. The water from the matrix tank was taken to the experimental units through a water recirculation system coupled to an aquarium pump and a 25  $\mu\text{m}$  polyester bag filter to remove solids. The pump was turned on only when the experimental units were renewed. Lighting was provided naturally inside an agricultural greenhouse with 70% shading. To evaluate the macroalgae growth, weekly weighing was performed with a digital scale and water excess was removed using a manual centrifuge before weighing. The daily growth rate was calculated according to the equation  $\text{GR} (\% \text{ day}^{-1}) = [(Fb / Ib)^{1/t} - 1] \times 100$ , where Fb (final biomass), Ib (initial biomass), and t (time), proposed by Yong et al. (2013). The density of each experimental unit was then adjusted to an initial density of  $6 \text{ g L}^{-1}$  and the remainder of the sample was saved for proximate and biochemical analyses. The proximate composition of the algae was performed according to the methods described by the Association of Official Analytical Chemists - International AOAC (1999).

#### *Ulva ohnoi dry weight*

To determine the dry weight, a wet sample of 5 g was put in a beaker and weighed on an analytical balance. The sample was then placed in an oven and dried at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  for 24 hours to remove water.

#### *Extraction and quantification of total phenolic compounds and photosynthetic pigments*

Samples of *U. ohnoi* (3 g fresh weight, n = 3) were macerated in a crucible with liquid N<sub>2</sub> and 5 mL of 80 % methanol (v/v) were added to them. The material was incubated for 1 h in the dark and then centrifuged (12000 g, 10 min). Finally, the supernatant was recovered by vacuum filtration. The total contents of phenolic compounds were determined

by the Folin-Ciocalteu colorimetric method ( $\lambda = 750 \text{ nm}$ ), as described by Rhandir et al. (2002). The gallic acid standard curve was used to calculate the analyte levels (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA – 100 - 1250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $y = 0.0108x$ ,  $r^2 = 0.999$ ). The results, in triplicate, were expressed in mg of gallic acid equivalent ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ) per g of dry mass.

The extraction and quantification of carotenoids and chlorophylls was performed with samples of fresh seaweed which were stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Chlorophylls and carotenoids were extracted with 1.5 mL of dimethyl sulfoxide at  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  for 40 min and quantified according to the methodology of Hiscox and Israelstam (1979). The equations used for obtaining the concentrations of chlorophylls and carotenoids are as follows:

$$\text{Chlorophyll A} = 12,9 * A_{665} - 3,45 * A_{649}$$

$$\text{Chlorophyll B} = 21,99 * A_{649} - 5,32 * A_{665}$$

$$\text{Total carotenoids} = (1000 * A_{480} - 2,14 \text{ chl A} - 70,16 \text{ chl b}) / 220$$

Where  $A_{480}$ ,  $A_{649}$  and  $A_{665}$  are the values obtained through reading the samples at the respective wavelengths in the spectrophotometer (480 nm, 649 nm and 665 nm).

#### *Extraction and quantification of total flavonoids*

The total flavonoid content was determined by the colorimetric method described by Chang et al. (2002), with adaptations to algal extract carried out by the research group of the Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory (LMBV). An aliquot of 0.5 mL of extract of each sample was used to determine the total flavonoid content in the presence of 0.5 mL of methanolic aluminum chloride solution (2%) and 2 aliquots of 5 mL of ethanol P.A. The material was then vortexed and the sample remained protected from light for 1 h. Then, the absorbance reading was performed at 420 nm in a UV-Visible spectrophotometer (UV-2000A, Instrutherm). The calculation of the total flavonoid content was based on the quercetin standard curve (10 to 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  –  $r^2 = 0.99$ ;  $y = 0.010x$ ). The analyzes were performed in triplicate and the results were expressed as mg of quercetin equivalent per g of dry mass of the extract.

#### *Ulvan extraction*

The ulvan polysaccharide extract was prepared according to the methodology described by Paulert et al. (2009) with modifications. Fresh macroalgae were autoclaved

following the proportion of 50 g of fresh mass to 300 mL of distilled water for two hours at 110 °C: 2 h. Then, the supernatant was incubated with three volumes of P.A ethanol for 48 h at -20 °C, and then filtered and lyophilized for 24 h at -54 °C and 0.160 mBar. Finally, the ulvan yield was calculated using the following formula:  $\text{ulvan yield} = \frac{[\text{dry ulvan (g)}/\text{fresh macroalgae (g)}] \times 100}{\text{percent dry matter}}$ . For this calculation, the dry ulvan obtained from the extraction and the fresh mass used in the process were considered, and the result was divided by the dry matter of the macroalgae.

### *Protein content*

The physical-chemical characterization analyzes were performed in triplicate according to the methodologies described by AOAC (1999): protein (LECO) Dumas method 990.03, conversion factor of 5 (Angell et al., 2016) and ether extract by Soxhlet using the 920.39C method.

### *Environmental variables*

Throughout the experiment, the following environmental variables were monitored: dissolved oxygen and temperature (YSI 55, YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA), as well as salinity (refractometer Instrutherm®) and illuminance (digital luxmeter Hikari HLX-881A) were measured twice a day. The illuminance values were measured above the water surface and were later converted to quantum irradiance ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) by multiplying them by 0.018 (Gensler, 1986).

The water quality variables of the matrix biofloc tank were measured with the following methods: salinity (YSI 55, YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA), pH (YSI 55, YSI Inc., Yellow Springs, OH, USA), TSS, alkalinity, total ammonia and nitrite-N (Strickland and Parsons 1984; APHA 1995), nitrate-N (HACH method 8039, cadmium reduction) and phosphate (Strickland and Parsons 1984; APHA 1995).

### *Statistical analysis*

All results were calculated as mean  $\pm$  standard deviation. The data were submitted to Shapiro-Wilk and Brown-Forsythe tests to assess the prerequisites of normality and homogeneity of variances, respectively. Then, an analysis of variance (one-way ANOVA) was used, followed by Dunnett's test of multiple comparisons. For the initial and final quantification of ulvan, Student's t test was used. In all cases, the significance level employed

was 5% and all analyses and visualizations were performed using the softwares GraphPad Prism version 9.2 and jamovi (The jamovi project, 2022).

Todos os resultados foram calculados com média e desvio padrão. Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe para comprovar os pré-requisitos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Em seguida foi utilizada a análise de variância (ANOVA *one way*), seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnet. Para a quantificação inicial e final da ulvana foi utilizado o Teste t de Student. Todos os testes estatísticos foram avaliados com um nível de significância de 5% e foram realizados no programa GraphPad Prism version 9.2.

## 2.3 RESULTADOS

### *Water quality*

The temperature, salinity, dissolved oxygen and photon irradiance of the laboratory cultivation period are presented in Table 1. Throughout the entire experiment, temperature ranged from 25.5°C to 29.9°C, salinity ranged from 38‰ to 40‰, dissolved oxygen ranged from 6.4 mg L<sup>-1</sup> to 8.5 mg L<sup>-1</sup> and photon irradiance ranged from 3.4 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> to 18.4 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

**Table 1.** Temperature, salinity, dissolved oxygen and photon irradiance: mean, minimum (min) and maximum (max) during 28 days of *Ulva ohnoi* cultivation in laboratory. Values are represented as mean ± standard deviation (n = 3).

Day	Temperature (°C)		Salinity (‰)		Dissolved oxygen (mg L <sup>-1</sup> )		Photon irradiance (μmol photons m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	
	Mean	Min - Max	Mean	Min - Max	Mean	Min - Max	Mean	Min - Max
7	27.5±0.4	26.3-29.4	40±0.0	39-40	7.2±0.2	6.4-7.9	15.3±10.4	12.8-17.1
14	27.9±1.6	26.0-29.8	39±0.5	39-40	7.7±0.4	7.1-8.5	11.4±12.3	5.5-18.4
21	28.0±1.4	26.8-29.9	39±0.0	38-40	7.6±0.2	7.0-8.3	11.7± 16.9	4.5-18.1
28	26.9±0.6	25.5-28.2	40±0.0	38-41	7.6±0.1	7.0-8.2	8.6±74.4	3.4-16.7

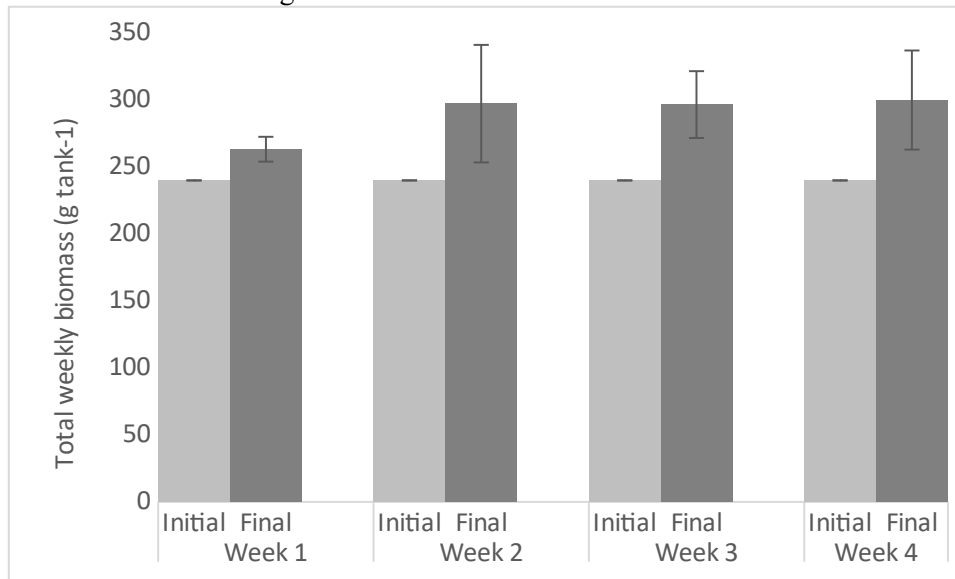
### *Algal growth performance and characterization of biocompounds*

Algae growth performance is presented in Table 2 and Figure 1. The overall specific growth rate across the experiment was 2.6±0.8 % day<sup>-1</sup>, while the accumulated final biomass before the weekly partial harvests was on average 289.3±15.2 g.

**Table 2.** Growth rates of *Ulva ohnoi* cultivated for 28 days in biofloc measured through weekly biomass gain and specific growth rate. Data are presented as arithmetic mean  $\pm$  standard deviation (n=3).

<i>U. ohnoi</i>	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Weekly biomass gain (g)	23.3 $\pm$ 9.3	57.3 $\pm$ 43.9	56.7 $\pm$ 24.9	60.0 $\pm$ 37.0
Specific growth rate (% day <sup>-1</sup> )	1.3 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 2.2	3.0 $\pm$ 1.2	3.2 $\pm$ 1.8

**Fig. 1** Total weekly total biomass (g) of *Ulva ohoi* cultivated using water from biofloc technology for 28 days after weekly partial harvests returning the standing biomass to the initial value. No statistical significance was observed across time.



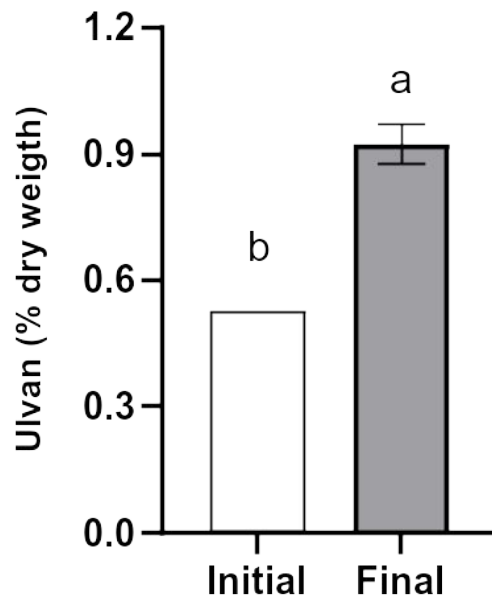
No statistical differences were observed in relation to the concentration of phenolic compounds and chlorophylls a and b (Table 3). Regarding flavonoids, a statistical difference was observed on days 7 and 14. It was also observed that carotenoids decreased approximately 41.3% in macroalgae cultivated after 28 days in bioflocs (Table 3). In the case of ulvan, a significant difference was observed when comparing the initial (0.54 $\pm$ 0.06%) and final (0.92 $\pm$ 0.05%) concentrations (Figure 2).

**Table 3.** Concentration of phenolic compounds, flavonoids, chlorophylls a and b, and carotenoids from *Ulva ohnoi* cultivated for 28 days using water from a biofloc system. The values represent the mean  $\pm$  confidence interval (n = 3) and the lowercase letters represent the significant differences among the days of cultivation (p < 0.05). DW: dry weight.

	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Phenolic compounds (mg EAG.g <sup>-1</sup> DW)	0.24 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.2	0.27 $\pm$ 0.1	0.19 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.01
Flavonoids (mg EQ.g <sup>-1</sup> DW)	0.3 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0.4 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.4 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.3 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.3 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
Chlorophyll a ( $\mu$ g g <sup>-1</sup> DW)	78.5 $\pm$ 4.4	63.4 $\pm$ 13.6	53.4 $\pm$ 36.4	71.8 $\pm$ 47.3	80.6 $\pm$ 28.2
Chlorophyll b ( $\mu$ g g <sup>-1</sup> DW)	70.1 $\pm$ 3.6	57.7 $\pm$ 14.1	62.8 $\pm$ 49.4	80.0 $\pm$ 44.4	72.4 $\pm$ 25.5
Carotenoids ( $\mu$ g g <sup>-1</sup> DW)	32.2 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>	29.2 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>	19.5 $\pm$ 11.4 <sup>b</sup>	24.5 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	18.9 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>

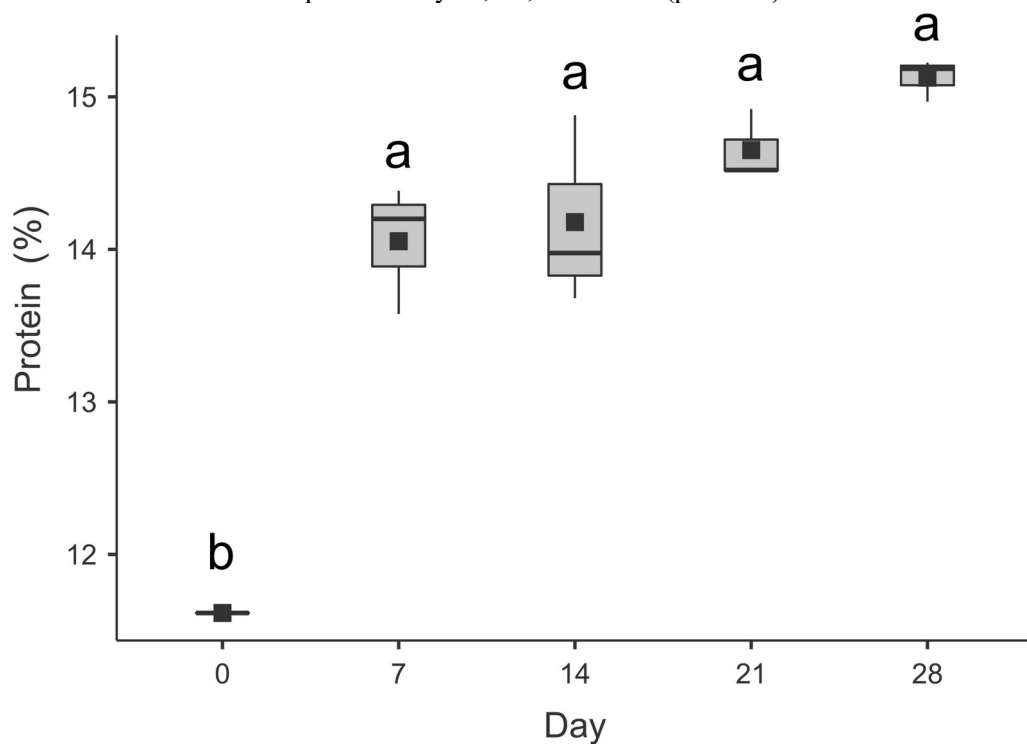


**Fig. 2** Yield of *Ulva ohnoi* ulvan at the beginning and end (after 28 days) of the culture period in water from a biofloc system. Values represent the mean  $\pm$  confidence interval ( $n = 3$ ) and the lowercase letters represent significant differences on initial and final yield ( $p < 0.05$ ).



Statistical differences were observed in protein concentration throughout the cultivation period, with values of  $14.52 \pm 0.1\%$  at the beginning and  $18.91 \pm 0.17\%$  at the end, representing an increase of 30.2 % (Figure 3).

**Fig. 3** Boxplot graph of protein concentration of *Ulva ohnoi* during the 28-day culture in biofloc. Squares denote the means ( $n = 3$ ) and letters represent the significant differences between day 0 compared to days 7, 14, 21 and 28 ( $p < 0.05$ ).



## 2.4 DISCUSSION

Various factors within the cultivation system employed in this study using water from a biofloc shrimp tank can affect both the growth performance and biochemical composition of *Ulva ohnoi*. This dynamic aquatic environment involves factors such as water quality variables, e.g. temperature, pH, and nutrient availability, in addition to light intensity. Moreover, the biofloc system's richness in nutrients, particularly nitrogen and phosphorus, creates favorable conditions for macroalgae growth (Khanjani et al., 2022). Understanding these interactions is essential for comprehending the mechanisms behind our observed results and gaining valuable insights into the nuances of *Ulva ohnoi* cultivation within the biofloc system.

Water quality parameters are essential to maintain adequate environmental conditions in aquaculture (Boyd and Tucker, 2014). In the present work, the water quality parameters were in the ideal range found for *U. ohnoi* species (Angell et al., 2015; Notoya, 1999; Ohno, 1988). Still, it is a fact that different species have different tolerance ranges to certain conditions, and regarding *U. ohnoi*, it is known that the ideal salinity range for growth fluctuates from 25 to 40‰, according to Angell et al., 2015. The fact that the salinity found in this study was close to the higher optimal limit could have negatively influenced its growth performance and biocompounds composition.

In addition to the water quality parameters, nutrient availability in the cultivation is another important factor for the growth of *Ulva* species (Imchen, 2012). Despite the nutrients available in biofloc, the macroalgae growth was relatively low due to some stressors, such as high stocking density. Martins et al. (2020) observed that *U. ohnoi* cultivated in biofloc under a dilution rate of 25% of biofloc water and 75% of seawater and a density of 2 g L<sup>-1</sup> had a significantly higher growth rate when compared to 4 g L<sup>-1</sup> density (4.3% day<sup>-1</sup> compared with 2.7% day<sup>-1</sup>, respectively). In both cases, the growth rate was higher than that observed in this study (2.6±0.8% day<sup>-1</sup>), which was possibly a result of the higher stocking density.

Another possibility for the low growth rate might have been the reduced light intensity brought about by the biofloc water which, although filtered, was not diluted in this experiment, as in other ones employing similar experimental designs, where growth rates ranging from 2.7% day<sup>-1</sup> (Martins et al., 2020) up to 8.0 % day<sup>-1</sup> (Morais et al., 2023) having been observed, with the filtered biofloc water comprising 25% and 20% of the macroalgae unit volume, respectively. However, due to the differences in stocking densities, the



confirmation of this hypothesis escapes the scope of this study, requiring a specific experimental design to answer it.

Having in view the prospect of including macroalgae in aquafeeds, the contents of antioxidant compounds (carotenoids, chlorophylls, phenolics, and flavonoids) are important because of their anti-inflammatory properties, in addition to the possibility of being used as alternative natural antibiotics (Peso-Echarri et al., 2012). These compounds vary according to the macroalgae species, spatial and temporal abiotic interactions within environmental parameters, anthropogenic interventions, and biotic interactions (Stengel et al., 2011).

Eismann et al. (2020) reported a wide range of carotenoids contents, from 0.005 to 900 mg g<sup>-1</sup> of fresh weight in *Ulva* sp. Raymundo et al. (2004) quantified carotenoid levels in green algae, obtaining average values ranging from 72.27 to 129.04 mg kg<sup>-1</sup>. The lowest content was found in the species *U. fasciata*, while the highest was observed in the macroalgae *Enteromorpha intestinalis*. Similarly, Legarda et al. (2021) found carotenoid concentrations values ranging from 4.99±0.73 µg g<sup>-1</sup> to 16.46±3.41 µg g<sup>-1</sup> of the fresh weight of *U. fasciata* integrated with shrimp and mullet in a biofloc system. There was a reduction of carotenoids at the end of the cultivation in the present study, but it remained within the values found in the literature. According to Chakraborty and Santa (2008), the profile of carotenoids (vitamins) in macroalgae depends on endogenous and exogenous factors, such as the difference in salinity from the place the macroalgae were collected to the place of cultivation. Kakinuma et al. (2004) reported that *U. pertusa* showed changes in some physiological and biochemical aspects when cultivated under salinity fluctuations. The authors also reported that, in response to high salinity, a decrease in the total pigment content (carotenoids and chlorophyll a and b) can be observed. These changes cause irreversible damage to the photosynthetic activity of the seaweed, which might explain both the reduction in carotenoid content throughout the experiment and the relatively poor growth rates observed in this study when compared to previous publications.

In the literature, chlorophyll values are diverse and expressed in different units because they can be determined by different extraction methods. Raymundo et al. (2004) reported average chlorophyll values ranging from 151.48 to 411.51 mg kg<sup>-1</sup> for the species *Chaetomorpha anteninna* and *Codium decorticatum*, respectively, determined through the use of acetone as the solvent. Legarda et al. (2021) found values of 72.15±12.07 (initial) and 294.66±16.46 µg g<sup>-1</sup> (final) of the fresh weight of *U. fasciata* cultivated in biofloc. Hiscox and Israelstam (1979) suggested that DMSO (dimethyl sulfoxide) is a superior method compared to acetone for extracting chlorophyll a and b in green algae. This is attributed to its high

diffusion capacity through semi-permeable membranes and its effectiveness as a protein carrier (Ronen and Galun, 1984). In the present work, there were no significant differences in chlorophyll concentrations through the DMSO method. A possible explanation is that the content and presence of pigments may vary according to factors such as reproduction, growth phase, environmental changes, and water salinity, the latter being a limiting factor for the species in this work (Chakraborty et al., 2010; Kakinuma et al., 2004; Kakinuma, 2006).

Phenol extraction yield depends on the variety of active compounds with different properties and polarities, which can be affected according to the solubility of the solvent. For the extraction of polyphenols from a plant matrix, polar solvents such as ethanol, methanol, acetone, and ethyl acetate are used (Parekh and Chanda, 2007). Legarda et al. (2021) quantified, using methanol as a solvent, the phenolic compounds of *U. fasciata* cultivated in biofloc and obtained values of  $0.32 \pm 0.05$  (initial) and  $0.19 \pm 0.03 \mu\text{g g}^{-1}$  (final) of dry weight. In the present work, methanol was also used as a solvent for the analysis of green macroalgae cultivated in biofloc, and results within the standards found in the literature were found (Dimova et al., 2019; Legarda et al., 2021). These concentrations may be the result of differences in the chemical composition among the phenolic compounds of the macroalgae, the solvents used in the protocols, or the involvement in the antioxidant activity of other compounds, such as chlorophylls and carotenoids (Raymundo et al., 2004). The same authors reported that for the species *E. intestinalis*, a higher percentage of inhibition (75%) was obtained with the methanolic extract, which had total phenolic values of  $610.31 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  of biomass. This was in comparison to *U. fasciata*, which had a similar statistically equivalent amount of phenolic compounds ( $635.53 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ). However, despite the similar levels of phenolic compounds, there were significant differences in the antioxidant effectiveness between the methanolic extracts of the two species, supporting the theory mentioned above.

Flavonoids represent one of the most important groups of phenolic compounds. The taxonomic classification and species distribution influence the metabolism and production of these compounds, which result in different concentrations (Machado et al., 2008). Al-Malki et al. (2018) evaluated the impact of several solvents on the flavonoid yield of *U. lactuca* collected in the Red Sea in Saudi Arabia, and found different values according to each solvent used in the methodology ( $34.5 \pm 4.8$  ethanol,  $60 \pm 7.0$  ethyl acetate,  $31.2 \pm 3.3$  chloroform, in mg QE/g extract). Seal et al. (2015) reported values of  $9397.0 \text{ mg EQ } 100 \text{ g}^{-1}$  and  $9894.0 \text{ mg EQ } 100 \text{ g}^{-1}$  of dried algae for extracts from the macroalgae *Nitella flagelliformis* using acetone and methanol as the solvents, respectively. In the present study, the solvent used in the methodology was ethanol, and we obtained a statistical difference in the second and third

weeks of cultivation. However, the biofloc system, in general, did not interfere with the flavonoid yields according to the values found in the literature about macroalgae collected in a natural environment (Al-Malki et al., 2018; Farasat et al., 2014).

Ulvan is the main water-soluble carbohydrate of members of the order Ulvales (Ray and Lahaye, 1995). In general, this polysaccharide has been gaining prominence due to its biological properties, such as anti-carcinogenic, anti-proliferative, antiviral, antioxidant, antihypertensive, anti-inflammatory, anticoagulant, among others (Collén et al., 2011; Costa et al., 2010; Glasson et al., 2017; Karnjanapratum and You, 2011; Qi et al., 2012). In aquaculture, ulvan has potential to be applied to aquafeeds due to possible improvements in feed efficiency, immunostimulant action, and enhancement of fish health (Peso-Echarri et al., 2012). Pitta et al. (2022) evaluated the performance of *U. fasciata* cultivated in IMTA at six different densities ranging from 1 to 6 kg m<sup>-3</sup>. They found values of ulvan in the algae biomass ranging from 14.2% to 18.4% of its dry weight using the methodology of Paulert et al. (2009). Similarly, Castelar et al. (2014), who also employed the same extraction method, reported ulvan productivity values of 15.6±5.2% for *U. flexuosa* cultivated in the sea, which were comparable to those cultivated in tanks at 20.2±3.9%. In the present work, where the same method of ulvan extraction was used, the cultivation of *U. ohnoi* in biofloc increased the concentration of this polysaccharide in the macroalgae by 75%. This increase is explained by the fact that ulvan is a heteropolysaccharide, which is present in the *Ulva* cell wall and is strongly associated with proteins (Collén et al., 2011; Karnjanapratum et al., 2011; Qi et al., 2012), which also increased in the macroalgae when comparing the initial sampling time with the final one.

In the biofloc system, nutrients such as nitrogen and phosphorus accumulate, and macroalgae can absorb and transform this nitrogen into protein (Duke et al., 1989). Our results clearly show this, since the macroalgae had 30 % more protein in their final composition, which showed that they can absorb the nitrogenous compounds offered by the biofloc system to increase the protein content. The same was found by Legarda et al. (2021), who cultivated the macroalgae *U. fasciata* in biofloc and obtained an increase of 182 % in the concentration of nitrogen in its composition at the end of the cultivation.

## 2.5 CONCLUSION

The cultivation of *Ulva ohnoi* in biofloc technology resulted in statistically significant increases in both protein and ulvan contents, which could have positive implications for its

application as a feed additive or a feed ingredient in aquafeeds. Room for future studies include possible effects of both salinity and stocking density in the biocompounds characterization of the species, both factors which could have affected the results of this study and would require further elucidation.

## 2.6 REFERENCES

- Al-Malki AL, Barbour EK, Al-Zahrani MH, Moselhy SS (2018) Impact of Various Solvents on Yield and Activity of Phenolics and Flavonoids of *Ulva lactuca* (Chlorophyta) Algae. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 24(3):1-7. DOI: [10.9734/JPRI/2018/44875](https://doi.org/10.9734/JPRI/2018/44875)
- Alves RA, Sousa RA, Reis RL (2013) A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *Journal of Applied Phycology*, 25: 407–424. DOI: [10.1007/s10811-012-9875-4](https://doi.org/10.1007/s10811-012-9875-4)
- Angell AR, Mata L, Nys R, Paul NA (2015) Indirect and direct effects of salinity on the quantity and quality of total amino acids in *Ulva ohnoi* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 51(3):536-545. DOI: [10.1111/jpy.12300](https://doi.org/10.1111/jpy.12300)
- Angell AR, Mata L, Nys R, Paul NA (2016) The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of Applied Phycology*, 28:511-524. DOI: [10.1007/s10811-015-0650-1](https://doi.org/10.1007/s10811-015-0650-1)
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 16th edn. OMA, Arlington, 1999.
- Avnimelech Y (2015) *Biofloc Technology*. Baton Rouge, Louisiana: A Practical Guide book, 3th. The World Aquaculture Society.
- Avnimelech Y, Ritvo G (2003) Shrimp and fish pond soils: Processes and management. *Aquaculture*, 220(1-4):549-567. DOI: [10.1016/S0044-8486\(02\)00641-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00641-5)
- Bikker P, Krimpen MMV, Wikselaar PV, Tan-Houweling B, Scaccia N, Hal JWV, Huijgen WJJ, Cone JW, Contreras-López AM (2016) Biorefinery of the green seaweed *Ulva lactuca* to produce animal feed, chemicals and biofuels. *Journal of Applied Phycology*, 28:3511-3525. DOI: [10.1007/s10811-016-0842-3](https://doi.org/10.1007/s10811-016-0842-3)
- Bolton JJ, Robertson-Andersson DV, Shuuluka D, Kandjengo L (2009) Growing *Ulva* (Chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South Africa: a swot analysis. *Journal of Applied Phycology*, 21:575-583. DOI: [10.1007/s10811-008-9385-6](https://doi.org/10.1007/s10811-008-9385-6)
- Boyd CE, Tucker CS (2014) *Handbook for aquaculture water quality*. Craftmaster Printers, Auburn, 439.
- Chakraborty S, Santa SC (2008) Biochemical composition of eight algae collected from Suberdan. *Indian Journal of Marine Science*, 37(3):329-332.

Chakraborty S, Santra SC, Bhattacharya T (2010) Seasonal variation of enzyme activity and stress metabolites in eight benthic macro algae with fluctuations in salinity of Sunderban estuary, India. *Indian Journal of Marine Sciences*, 39(3): 429-433.

Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food Drug Analysis* 10(3):178-182. DOI: [10.38212/2224-6614.2748](https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748)

Chopin T, Buschmann CH, Troell M, Kautsky N, Neori A, Kraemer GP, González-Zertuche JA, Yarish C, Neefus C (2001) Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. *Journal of Phycology*, 37(6):975-986. DOI: [10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x)

Cohen I, Neori A (1991) *Ulva lactuca* Biofilters for Marine Fishpond Effluent. I. Ammonium Uptake Kinetics and Nitrogen Content. *Botanic Marine*, 34:475-482. DOI: [10.1515/botm.1991.34.6.475](https://doi.org/10.1515/botm.1991.34.6.475)

Collén PN, Sassi JF, Rogniaux H, Marfaing H, Helbert W (2011) Ulvan Lyases Isolated from the Flavobacterium *Persicivirga ulvanivorans* Are the first Members of a New Polysaccharide Lyase Family. *Journal of Biological Chemistry*, 286:42063-42071. DOI: [10.1074/jbc.M111.271825](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.271825)

Costa L (2010) Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64: 21-28.

Crab R, Avnimelech Y, Defoirdt T, Bossier P, Verstraete W (2007) Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270(1-4):1-14. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2007.05.006](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.05.006)

Cruz-Suárez LE, León A, Peña-Rodríguez A, Rodríguez-Peña G, Moll B, Ricque-Marie D (2010) Shrimp: *Ulva* co-culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture*, 301(1-4):64-68. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2010.01.021](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.021)

Dimova, D, Dobreva, D, Panayotova, V, Makedonski L (2019) Dpph antiradical activity and total phenolic content of methanol and ethanol extracts from macroalgae (*Ulva rigida*) and microalgae (*Chlorella*). *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, 6(2): 37-41. DOI: [10.14748/spp.v7i2.7369](https://doi.org/10.14748/spp.v7i2.7369)

Duke CS, Litaker W, Ramus J (1989) Effects of temperature, nitrogen supply, and tissue nitrogen on ammonium uptake rates of the Chlorophyte seaweeds *Ulva curvata* and *Codium decortatum*. *Journal of Phycology*, 25(1):113-120. DOI: [10.1111/j.0022-3646.1989.00113.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1989.00113.x)

Eismann AI, Reis RP, Silva AF, Cavalcanti DN (2020) *Ulva* spp. carotenoids: Responses to environmental conditions. *Algal Research*, 48:101916. DOI: [10.1016/j.algal.2020.101916](https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101916)

Farasat M, Khavari-Nejad RA, Nabavi SMB, Namjooyan, F (2014) Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1): 163-170.

Gensler WG (1986) Advanced agricultural instrumentation: design and use. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers. 480.

Glassom CRK, Sims IM, Carnachan SM, Nys R, Magnusson M (2017) Cascading biorefinery process targeting sulfated polysaccharides (ulvan) from *Ulva ohnoi*. Algal Research, 27(12):83-391. DOI: [10.1016/j.algal.2017.07.001](https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.001)

Goodwin TW (1962) Carotenoids, their comparative biochemistry, 3<sup>rd</sup> ed, Chemical Pub. Co., New York, 378.

Guaratini T, Cardozo KHM, Pinto E, Colepicolo P (2009) Comparison of Diode Array and Electrochemical Detection in the C30 Reverse Phase HPLC Analysis of Algae Carotenoids. Journal of Brazilian Chemistry Society, 20(9):1609-1616. DOI: [10.1590/S0103-50532009000900007](https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000900007)

Hiscox JD, Israelstam GF (1979) A Method for Extraction of Chlorophyll from Leaf Tissue without Maceration. Journal of Botanic, 57(12):1332-1334. DOI: [10.1139/b79-163](https://doi.org/10.1139/b79-163)

Hoang TH, Qin JG, Stone DAJ, Harris JO, Duong DN, Bansemer MS (2016) Colour changes of greenlip abalone (*Haliotis laevis* Donovan) fed fresh macroalgae and dried algal supplement. Aquaculture, 456:16-23. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2016.01.022](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.022)

Imchen T (2012) Recruitment Potential of a Green Alga *Ulva flexuosa* Wulfen Dark Preserved Zoospore and Its Development. Plos One, 7(3):32651. DOI: [10.1371/journal.pone.0032651](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032651)

Kakinuma M, Coury DA, Kuno Y, Kozawa Y, Inagaki E, Yoshiura Y, Amano H (2006) Physiological and biochemical responses to thermal and salinity stresses in a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta). Marine Biology, 149:97-106. DOI: [10.1007/s00227-005-0215-y](https://doi.org/10.1007/s00227-005-0215-y)

Kakinuma M (2004) Salinity stress responses of a sterile mutant of *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta). Fishery Science, 70(6):1177-1179. DOI: [10.1111/j.1444-2906.2004.00921.x](https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2004.00921.x)

Karnjanapratum S, You SG (2011) Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. International Journal of Biological Macromolecules, 48:311-318. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2010.12.002](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.12.002)

Khanjani MH, Zahedi S, Mohammadi A (2022) Integrated multitrophic aquaculture (IMTA) as an environmentally friendly system for sustainable aquaculture: functionality, species, and application of biofloc technology (BFT). Environmental Science Pollution Research, 29:67513–67531. DOI: [10.1007/s11356-022-22371-8](https://doi.org/10.1007/s11356-022-22371-8)

Khoi LV, Fotedar R (2011) Integration of western king prawn (*Penaeus latisulcatus* kishinouye, 1896) and green seaweed (*Ulva lactuca* Linnaeus, 1753) in a closed recirculating aquaculture system. Aquaculture, 322-323:201-209. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2011.09.030](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.030)

La Macchia Pedra AG, Ramlov F, Maraschin M, Hayashi L (2017) Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with effluents from shrimp cultivation and brown seaweed

extract: Effects on growth and secondary metabolism. *Aquaculture*, 479:297–303. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2017.06.005](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.005)

Lahaye M, Axelos MAV (1993) Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweed (*Ulva* spp.). *Carbohydrates Polymers*, 22(4):261-265. DOI: [10.1016/0144-8617\(93\)90129-R](https://doi.org/10.1016/0144-8617(93)90129-R)

Lapointe BE, Tenore KR (1981) Experimental outdoor studies with *Ulva fasciata* Delile I Interacion of light and nitrogen on nutrient uptake, growth, and biochemical composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 53:135-152. DOI: [10.1016/0022-0981\(81\)90015-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(81)90015-0)

Legarda EC, Silva D, Miranda CS, Pereira PKM, Martins MA, Machado C, Lorenzo MA, Hayashi L, Vieira FN (2021) Sea lettuce integrated with Pacific white shrimp and mullet cultivation in biofloc impact system performance and the sea lettuce nutritional composition. *Aquaculture*, 534:736265. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2020.736265](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736265)

Machado H, Nagem TJ, Peter VM, Fonseca CS, Oliveira TT (2008) Flavonoids and potential therapeutic. *Bolotem do Centro de Biologia da Reprodução*, 27(1-2) 33-39.

Martins MA, Silva VF, Tarapuez PR, Hayashi L, Vieira FN (2020) Cultivation of the seaweed *Ulva* spp. with effluent from a shrimp biofloc rearing system: Different species and stocking density. *Boletim do Instituto de Pesca*, 46(3):602. DOI: [10.20950/1678-2305.2020.46.3.602](https://doi.org/10.20950/1678-2305.2020.46.3.602)

Morais APM, Santos IL, Carneiro RFS, Routledge EAB, Hayashi L, Lorenzo MA, Nascimento Vieira F (2023) Integrated multitrophic aquaculture system applied to shrimp, tilapia, and seaweed (*Ulva ohnoi*) using biofloc technology. *Aquaculture*, 572:739492. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2023.739492](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739492)

Naldi M, Viaroli P (2002) Nitrate uptake and storage in the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh in relation to nitrate availability and thallus nitrate content in a eutrophic coastal lagoon (Sacca di Goro, Po River Delta, Italy). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269(1):65-83. DOI: [10.1016/S0022-0981\(01\)00387-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00387-2)

Nelson SG, Glenn EP, Conn J, Moore D, Walsh T, Akutagawa M (2001) Cultivation of *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta) in shrimp-farm effluent ditches and floating cages in Hawaii: a two-phase polyculture system. *Aquaculture*, 193(3-4):239-248. DOI: [10.1016/S0044-8486\(00\)00491-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00491-9)

Notoya M (1999) Utilization of *Ulva* spp. and environmental restoration. *Seizandou*, Tokyo 137-143.

Ohno M (1988) Seasonal Changes of the Growth of Green Algae, *Ulva* sp. in Tosa Bay, Southern Japan. *Marine fouling*, 7(1-2):13-17. DOI: [10.4282/sosj1979.7.13](https://doi.org/10.4282/sosj1979.7.13)

Parekh J, Chanda SV (2007) In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology*, 31:53-58.

Paulert R, Talamini V, Cassolato JEF, Duarte MER, Nosedá MD, Jr Smania, A Stadnik, MJ (2009) Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva*

*fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Plant Diseases and Protection, 116:263-270.

Peso-Echarri P, Frontela-Saseta C, González-Bermúdez CA, Ros-Berruezo GF, Martínez-Graciá C (2012) Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. Revista de Biología Marina y Oceanografía, 47(3):373-381. DOI: [10.4067/S0718-19572012000300001](https://doi.org/10.4067/S0718-19572012000300001)

Pitta JPMP, Pontes MD, Castelar B, Hamacher C (2022) Desempenho de curto prazo de *Ulva fasciata* produzida em diferentes densidades em aquicultura multitrófica integrada. Conjecturas, 22(9):1-17. DOI: [10.53660/CONJ-1385-AG05](https://doi.org/10.53660/CONJ-1385-AG05)

Qi H, Liu X, Zhang J, Duan Y, Wang X, Zhang Q (2012) Synthesis and antihyperlipidemic activity of acetylated derivative of ulvan from *Ulva pertusa*. International Journal of Biological Macromolecules, 50: 270-272. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2011.11.006](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.11.006)

Randhir R, Shetty P, Shetty k (2002) L-Dopa and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. Process Biochemistry, 37 (11): 1247-1256. DOI: [10.1016/S0032-9592\(02\)00006-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00006-7)

Ray B, Lahaye M (1995) Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (ulvales, chlorophyta). Extraction and chemical composition. Carbohydrate Research, 274: 252-261. DOI: [10.1016/0008-6215\(95\)00138-J](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00138-J)

Raymundo MS, Horta P, Fett R (2004) Antioxidant in vitro activity of extracts of some green seaweed (Chlorophyta) from southern Brazilian coast. Revista Brasileira Ciências Farmaceutica, 40(4): 495-503. DOI: [10.1590/S1516-93322004000400007](https://doi.org/10.1590/S1516-93322004000400007)

Revilla-Lovano S, Sandoval-Gil JM, Zertuche-González JA, Belando-Torres MD, Bernardeau-Esteller J, Rangel-Mendoza LK, Ferreira-Arrieta A, Guzmán-Calderón JM, Camacho-Ibar VF, Muñoz-Salazar R, Ávila-López M del C (2021) Physiological responses and productivity of the seaweed *Ulva ohnoi* (Chlorophyta) under changing cultivation conditions in pilot large land-based ponds. Algal Research, 56:102316. DOI: [10.1016/j.algal.2021.102316](https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102316)

Ronen R, Galun M (1984) Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. Environmental and Experimental Botany, 24(3):239-245. DOI: [10.1016/0098-8472\(84\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0098-8472(84)90004-2)

Seböck S, Herppich WB, Hanelt D (2017) Development of an innovative ring shaped cultivation system for a land-based cultivation of marine macroalgae. Aquacultural Engineering, 77:33-41. DOI: [10.1016/j.aquaeng.2017.01.005](https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2017.01.005)

Seal T, Halder N, Chaudhuri K, Sinha SN (2015) Evaluation of antioxidant activities of algae and effect of solvent extraction system. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 6(3):1273.

Silva KR, Wasielesky Jr. W, Abreu PC (2013) Nitrogen and phosphorus dynamics in the biofloc production of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society, 44:30–41. DOI: [10.1111/jwas.12009](https://doi.org/10.1111/jwas.12009)



Stengel DB, Connan S, Popper ZA (2011) Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, 29(5):483-501. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2011.05.016](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.016)

Thakur DP, Lin CK (2003) Water quality and nutrient budget in closed shrimp (*Penaeus monodon*) culture systems. *Aquacultural Engineering*, 27:159–176. DOI: [10.1016/S0144-8609\(02\)00055-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(02)00055-9)

The jamovi project (2022). jamovi. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

Troell M, Halling C, Neori A, Choppin T, Buschmann AH, Kautsky N, Yarish C (2003) Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture*, 226(1-4):69-90. DOI: [10.1016/S0044-8486\(03\)00469-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00469-1)

Valente LMP, Rema P, Gouveia A, Matos J (2006) Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 252(1):85-91. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2005.11.052](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.052)

Van Wyk P, Scarpa J (1999) Water Quality and Management. In: Van Wyk, P., et al. (Eds.), *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*, Harbor Branch Oceanographic Institution, p. 128-138.

Xu Y, Fang J, Tang Q, Lin J, Le G, Liao LV (2008a) Improvement of water quality by the macroalga, *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta), near aquaculture effluent outlets. *Journal World Aquaculture Society*, 39(4). DOI: [10.1111/j.1749-7345.2008.00180.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00180.x)

Xu Y, Fang J, Wei W (2008b) Application of *Gracilaria lichenoides* (Rhodophyta) for alleviating excess nutrients in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 20(2):199-203. DOI: [10.1007/s10811-007-9219-y](https://doi.org/10.1007/s10811-007-9219-y)

Yong YS, Yong WTL, Anton A (2013) Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. *Journal of Applied Phycology*, 25:1831-1834. DOI: [10.1007/s10811-013-0022-7](https://doi.org/10.1007/s10811-013-0022-7)



### **3 ARTIGO 2- *Ulva ohnoi* cultivada em bioflocos utilizada como aditivo alimentar para o camarão-branco-do-pacífico**

Jamilly Sousa Rocha<sup>1\*</sup>, Daniele Santos<sup>1</sup>, Flávia Banderó Hoffing<sup>1</sup>, Camilla, Souza Miranda<sup>1</sup>, Jaqueline da Rosa Coelho<sup>1</sup>, Mateus Aranha Martins<sup>1</sup>, Felipe do Nascimento Vieira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Catarina [<https://ror.org/041akq887>] – Centro de Ciências Agrárias – Departamento de Aquicultura – Laboratório de Camarões Marinhos, Florianópolis (SC), Brasil.

**\*Corresponding author:** [jamillysr@hotmail.com](mailto:jamillysr@hotmail.com)

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a suplementação da macroalga *Ulva ohnoi* cultivada em bioflocos em dietas para o *Litopenaeus vannamei* cultivado em água clara, sobre os parâmetros zootécnicos, imunológicos, microbiológicos, sobrevivência dos animais desafiados com *Vibrio parahaemolyticus* e a resistência ao choque térmico dos camarões. Foram avaliadas três inclusões de biomassa seca da alga (0,5%, 1% e 2%) e uma dieta controle (sem macroalga), em quadruplicata, totalizando 16 unidades experimentais. Após o período de 6 semanas, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para os parâmetros zootécnicos, imunológicos, quantificação de bactérias heterotróficas totais e vibrionacea dos camarões, desafio com o *Vibrio* e a mortalidade após choque térmico agudo. A inclusão da *U. ohnoi* na dieta do camarão-branco-do-pacífico não foi suficiente para melhorar significativamente os parâmetros analisados.

**Palavras-chave:** *Litopenaeus vannamei*, macroalga, imunidade, *Vibrio*, choque térmico.

## Abstract

The present work aimed to evaluate the supplementation of the seaweed *Ulva ohnoi* from a biofloc system in diets for *Litopenaeus vannamei* cultured in clear water on growth performance, immunological parameters, gut microbiota, challenge with *Vibrio parahaemolyticus*, and resistance to thermal shock. Three different levels of dry biomass of the seaweed (0.5, 1 and 2%) and a control diet (without seaweed) were evaluated in quadruplicate, a total of 16 experimental units. After 6 weeks of culture, no significant differences were observed among the treatments for growth performance, immunological parameters, quantification of total heterotrophic bacteria and Vibrionaceae, challenge with *V. parahaemolyticus*, and mortality after thermal shock. The different levels of inclusion of *U. ohnoi* in the diet for Pacific white shrimp were not enough to significantly improve the evaluated parameters.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, macroalgae, immunity, vibrio, thermal shock.

### 3.1 INTRODUÇÃO

O camarão *Litopenaeus vannamei* é o crustáceo mais cultivado em todo o mundo (FAO, 2020) pois possui rápido crescimento, bom aproveitamento e conversão alimentar e capacidade de adaptação a uma ampla faixa de temperatura e salinidade (GUERRELHAS *et al.*, 2011). Entretanto, estes animais estão suscetíveis a doenças bacterianas e virais que acometem os cultivos, gerando prejuízos através de altas mortalidades (LIGHTNER, 2011). Uma das estratégias utilizadas para controlar as infecções microbianas é o uso de antibióticos. Porém, a utilização indiscriminada desses medicamentos pode induzir uma forte pressão seletiva sobre os patógenos dos animais aquáticos, resultando no aparecimento de cepas multirresistentes, além de causar danos à saúde dos animais e impactos negativos ao meio ambiente (BURRIDGE *et al.*, 2010; VATSOS; REBOURS, 2015; WANG *et al.*, 2021).

A partir da problemática com o uso de antibióticos, tem-se observado nas últimas décadas um incremento na demanda por compostos bioativos menos agressivos, que atuem combatendo os potenciais patógenos, gerando efeito benéfico sobre os organismos vivos. As macroalgas têm sido investigadas como parte destes compostos, sendo classificadas como excelentes fontes de compostos bioativos naturais, que podem ser extraídos e utilizados nas indústrias farmacêutica e cosmética, como biofertilizantes e como ingrediente em ração animal (ZHANG *et al.*, 2012).

O gênero *Ulva* é um dos mais estudados entre as algas marinhas, apresentando características interessantes para sua aplicabilidade. Possui um rápido crescimento e boa capacidade para absorção de nutrientes do meio. Podem conter de 15-65% de polissacarídeos em sua composição em relação ao peso seco e são produtoras de Ulvana, um composto rico em ramnose, ácido urônico e xilose, com grande importância comercial (HOLDT; KRAAN, 2011). A Ulvana é um polissacarídeo que apresenta atividades promissoras, tais como anticarcinogénica, antiproliferativa, antiviral, antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, anticoagulante, entre outras (COLLÉN *et al.* 2011; COSTA *et al.* 2010; GLASSON *et al.* 2017; QI *et al.* 2012).

Na aquicultura, a *Ulva* sp. tem aplicação na biorremediação em efluentes de cultivos (MASALÓ *et al.*, 2016), absorvendo e incorporando os nutrientes disponíveis na água, melhorando assim sua composição nutricional e bioquímica, abrindo possibilidades do seu uso para outras aplicações (SHAHAR; GUTTMAN, 2020). Um exemplo, é o uso na alimentação dos animais, pois sua biomassa possui polissacarídeo ulvana e aminoácidos que agregam valor a cadeia de produção por serem nutricionalmente benéficos (MATA *et al.*,

2016; GLASSON *et al.*, 2017). A suplementação de *Ulva clathrata* na alimentação do camarão, proporcionou efeito positivo na taxa de crescimento de 60% e diminuiu a taxa de conversão alimentar em até 45% (CRUZ-SUÁREZ *et al.*, 2010). A adição de macroalgas na dieta pode atuar diretamente na melhora da imunidade dos animais, pois sua estrutura complexa de polissacarídeos possui ações prebióticas (HAMED *et al.*, 2015; SCHLEDER *et al.*, 2017; VALENTE *et al.* 2006).

Vários relatos afirmam efeitos benéficos da suplementação com algas em animais aquáticos. Visando melhorar o potencial destes efeitos, Rocha *et al.* (dados não publicados) cultivaram a *U. ohnoi* em bioflocos durante 28 dias, e observaram aumento de 30.2% na concentração proteica e aumento de 75% na produtividade final da ulvana. Diante disto, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial do uso da macroalga *U. ohnoi* cultivada em bioflocos como aditivo alimentar em dietas para *Litopenaeus vannamei* sobre os parâmetros zootécnicos, microbiológicos, imunológicos, resistência vibrionacea e alterações de temperaturas.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

#### *Animais experimentais*

Os camarões utilizados foram da espécie *L. vannamei*, adquiridos da empresa Aquatec Aquacultura Ltda (RN), linhagem SPEEDLINE AQUA. O camarão foi cultivado em sistema de bioflocos até alcançar o peso inicial do experimento. Após isso, eles foram transferidos para as unidades experimentais, permanecendo por 8h sem alimentação, a fim de adaptar-se às condições de água clara.

#### *Biomassa seca das macroalgas*

A macroalga *U. ohnoi* foi cultivada por 28 dias em sistema de bioflocos, sendo coletadas e secas a 40 °C por 24h. Em seguida, foram moídas, peneiradas (600 µm) e armazenadas em sacos plásticos no freezer -20 °C até a sua utilização.

**Tabela 4.** Composição bioquímica da macroalga *U. ohnoi* após ser cultivada 28 dias em sistema de bioflocos.

	Compostos fenólicos (mg EAG.g <sup>-1</sup> do peso seco)	Flavonoides (mg EQ.g <sup>-1</sup> do peso seco)	Clorofila a (µg g <sup>-1</sup> do peso seco)	Clorofila b (µg g <sup>-1</sup> do peso seco)	Carotenoides (µg g <sup>-1</sup> do peso seco)
<i>Ulva ohnoi</i>	0,19±0,01	0,32±0,03	80,60±28,2	72,40±25,5	18,90±1,5

*Produção e composição química das dietas*

As dietas foram formuladas utilizando o programa Optimal Fórmula 2000® versão 19102009, baseado nas recomendações e exigências nutricionais para o camarão-branco-do-pacífico (GONG *et al.*, 2000; NRC, 2011; ZHOU *et al.*, 2012). Os ingredientes secos foram previamente moídos e peneirados a 600 µm. Posteriormente, os microingredientes foram homogeneizados por 10 min e adicionados aos macroingredientes, os quais foram homogeneizados por mais 10 min utilizando um misturador. Em seguida, foram adicionados os óleos, lecitina de soja e água (200 mL kg<sup>-1</sup> de dieta), e a mistura resultante peletizada, sob temperatura máxima de 50 °C em uma microextrusora (Inbramaq MX-40). Nas dietas experimentais, as algas marinhas foram adicionadas com níveis de 0,5%, 1% e 2% em substituição ao caulim, enquanto a dieta controle foi a mesma composição de ingredientes sem adição de algas. As dietas foram produzidas no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas - LABNUTRI/UFSC.

**Tabela 5:** Formulação da dieta com a suplementação da massa seca da macroalga *U. ohnoi*. utilizada no experimento para camarão-branco-do-pacífico.

Ingredientes	Inclusão %			
	Controle	0,5%	1%	2%
<b>Farelo de Soja</b>	31,00	31,00	31,00	31,00
<b>Farinha de Trigo</b>	16,00	16,00	16,00	16,00
<b>Farinha de Vísceras de Frango</b>	15,00	15,00	15,00	15,00
<b>Farinha de Peixe (Nacional)</b>	12,53	12,53	12,53	12,53
<b>Lecitina de soja</b>	1,80	2,00	2,00	2,00
<b>Fosfato Monocálcico</b>	2,50	2,40	2,40	2,40
<b>Sulfato de Magnésio</b>	1,60	1,50	1,50	1,50
<b>Cloreto de Sódio P.A</b>	1,50	1,50	1,50	1,50
<b>Cloreto de Potássio KCl</b>	1,50	1,50	1,50	1,50
<b>DL-Metionina</b>	0,50	0,50	0,50	0,50
<b>Premix Vitamínico</b>	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>Premix Mineral</b>	1,50	1,50	1,50	1,50
<b>Vit. C - ácido ascórbico</b>	0,07	0,07	0,07	0,07
<b>Óleo de Peixe</b>	1,50	2,00	2,00	2,00
<b>Óleo de Soja</b>	1,50	1,00	1,00	1,00
<b>Carboximetilcelulose (CMC)</b>	0,50	0,50	0,50	0,50
<b>Caulim</b>	10,00	9,50	9,00	8,00
<b>MACROALGA <i>Ulva ohnoi</i></b>	0	0,5	1	2
<b>TOTAL</b>	100,00	100,00	100,00	100,00
<b>Proteína bruta%</b>	35,00			
<b>Proteína digestível %</b>	30,09			
<b>Energia kcal/kg</b>	3790,58			

<b>E. digestível kcal/kg</b>	2949,23
<b>Extrato etéreo %</b>	8,20

---

#### *Delineamento e condições experimentais*

O cultivo foi realizado durante o período de 42 dias, em sala experimental com sistema de distribuição de água salgada oriunda da praia da Barra da Lagoa (Florianópolis, SC, Brasil), fornecimento de aeração constante e aquecedores com termostato mantendo a temperatura em  $28,4 \pm 0,59$  °C. Foram utilizados como unidades experimentais 16 tanques circulares de polietileno, com volume útil de 400 L. O experimento contou com 4 tratamentos realizados em quadruplicata. Cada unidade experimental foi povoada com 40 camarões com peso médio inicial de  $2,9 \pm 0,01$  g. As alimentações ocorreram quatro vezes ao dia e foram ajustadas de acordo com as biometrias semanais e a sobrevivência, seguindo uma conversão programada estimada (Ray *et al.*, 2010). Para o procedimento da biometria semanal, todos os animais foram retirados do tanque, contados e pesados, tendo a próxima alimentação ajustada. A renovação de água foi realizada diariamente, no período da manhã, a uma taxa de 70% do volume total do tanque, com remoção total dos restos de matéria orgânica (fezes, restos de ração e mudas). A temperatura e oxigênio dissolvido foram mensurados uma vez ao dia (multiparâmetro YSI, Professional Plus). Uma vez por semana, foram analisados o pH (pHmetro YSI 100<sup>®</sup>), alcalinidade (APHA, 2005- 2320 B), salinidade (refratômetro Instrutherm<sup>®</sup>), amônia e nitrito (Strickland; Parsons, 1972).

#### *Avaliação dos parâmetros zootécnicos*

Ao término do experimento foi realizada a biometria final de todos os camarões cultivados em cada unidade experimental para obtenção dos parâmetros zootécnicos, conforme indicado abaixo: - Ganho de Peso Semanal (g/s) = {[peso médio final (g) – peso médio inicial (g)] / dias de cultivo} \* 7; - Peso Final (g) dos animais ao final do experimento; - Conversão Alimentar (CA) = ração consumida (kg)/biomassa de camarão produzida (kg); - Sobrevivência (%) = (número final de camarões / número inicial de camarões) \* 100.

#### *Análise de parâmetros hemato-imunológicos*

Após o término do experimento a hemolinfa foi coletada do sinus ventral de dez camarões por tanque (quatro pools por tratamento), utilizando seringas estéreis de 1 mL resfriadas a 4 °C. Após a hemolinfa foi coagulada a 4 °C, macerada e centrifugada a 6.000 xg



por 10 min para obtenção do soro, no qual foi aliqotado e estocado a -20 °C. A concentração total da proteína do soro foi realizada em microplacas de 96 poços (fundo chato) e estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro-albumina bovina como padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. A atividade da enzima fenoloxidase (PO) foi determinada por espectrofotometria (490 nm) pela formação do pigmento DOPA-cromo, após a oxidação do substrato L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). As amostras do soro foram diluídas (1:15) em TBS-1 (Tris 1 mM, NaCl 336 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.6). Desta solução, 50 µL foram incubados em um volume igual de tripsina (Sigma, 1 mg mL<sup>-1</sup>) indutor enzimático, em microplacas de 96 poços (fundo chato) por 5 min a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 50 µL de L-DOPA (Sigma, 3 mg mL<sup>-1</sup>) em todos os poços e a formação do DOPA-cromo foi monitorada após 5, 10 e 15 min. Nos controles, a tripsina foi substituída por TBS. A atividade da PO foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na absorbância/minuto/miligrama de proteína (SÖDERHÄLL; HÄLL, 1984). Para a análise da capacidade aglutinante do soro, inicialmente foram depositados 50 µL da solução TBS-2 (Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) em todos os poços da microplaca de fundo em “U”. Em seguida, foi adicionado no primeiro poço o soro diluído (1:15) em TBS-2 e realizado as diluições seriadas até o 12° poço. Ao final, 50 µL da solução de eritrócitos caninos a 2% foram adicionados em cada poço, misturados e incubados por 2h em câmara úmida e a temperatura ambiente. Nos poços controle, o soro dos camarões foi substituído por TBS-2. O título aglutinante foi definido como o recíproco da última diluição capaz de aglutinar os eritrócitos (MAGGIONI *et al.*, 2004).

#### *Análise da microbiota do trato intestinal*

Para esta análise foram amostrados intestinos de dez camarões de cada tanque (quatro pools por tratamento), totalizando quarenta camarões por tratamento. Os tratos intestinais foram assepticamente extraídos, homogeneizados em um gral e diluídos serialmente (1/10) em solução salina estéril 3%. Após, foram semeados em meio de cultura TSA (do inglês, Agar Tryptic Soy), TCBS (do inglês, Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar) e ágar MRS para contagem de bactérias heterotróficas totais, *Vibrio* spp. totais e bactérias lácticas, respectivamente. Os intestinos semeados nas placas de TSA e TCBS foram incubados em estufa a 30 °C, por 24h, as placas de MRS incubadas em estufa a 35 °C, por

48h e posteriormente foi realizada as contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC).

#### *Desafio experimental com *Vibrio parahaemolyticus**

Ao final do cultivo, quarenta camarões de cada tratamento foram transferidos para outra sala experimental e distribuídos em dezesseis unidades experimentais de 70 L com 57 aeração constante. Pela parte dorsal do primeiro segmento abdominal os camarões foram inoculados com 100  $\mu\text{L}$  de solução de *V. parahaemolyticus* em uma concentração de  $9 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  segundo teste DL50 realizado previamente. Os animais foram mantidos por 48h, sem alimentação e durante esse período foi avaliada a mortalidade.

#### *Choque térmico*

Após seis semanas de experimento, quarenta camarões de cada tratamento foram transferidos dos tanques com água na temperatura de  $28,3 \pm 0,6$  °C para uma outra sala experimental contendo aquários de 60 L com água salgada na temperatura de  $11,7 \pm 0,1$  °C (segundo teste TL 50 realizado previamente) e com aeração constante. Os animais foram mantidos nessa temperatura por 1h e em seguida transferidos para os tanques com água salgada na temperatura de  $28,7 \pm 0,3$  °C. Os camarões foram monitorados por 48h, sem alimentação e durante esse período foi avaliada a mortalidade.

#### *Análises estatísticas*

Os dados de contagem de bactérias do intestino foram transformados para  $\log_{10}(x + 1)$ , e os de título aglutinante foram transformados em  $\log_2(x + 1)$  antes de serem submetidos a análise estatística. A homocedasticidade e a normalidade dos dados foram avaliadas com o teste de Levene e o teste de Shapiro-Wilk, respectivamente. Os dados de sobrevivência do choque térmico e infecção experimental foram analisados por Kaplan-Meier. Todos os testes estatísticos foram avaliados com um nível de significância de 5% e foram realizados no Statistica 10 (StatSoft).

### 3.3 RESULTADOS

#### *Parâmetros da qualidade de água*

O oxigênio e a temperatura foram mantidos em  $5,90 \pm 0,41 \text{ mg L}^{-1}$  e  $28,4 \pm 0,59 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente, e permaneceram constantes ao longo de todo o experimento. A média para a amônia total foi de  $1,08 \pm 0,52 \text{ mg L}^{-1}$ , nitrito  $0,03 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ , pH de  $8,14 \pm 0,06$ , salinidade  $32,51 \pm 0,77 \text{ g L}^{-1}$  e alcalinidade  $124 \pm 7,16 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ . Todos os parâmetros estão dentro dos padrões recomendados para a espécie (WAN WYK; SCARPA, 1999).

#### *Parâmetros zootécnico*

Após o período de seis semanas, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros zootécnicos analisados, conforme descrito na Tabela 6.

**Tabela 6.** Parâmetros zootécnicos do *L. vannamei* alimentados com dietas contendo a macroalga *U. ohnoi* em diferentes níveis (0,5%, 1%, 2%) e dieta controle (sem suplementação).

Tratamentos	Controle	0,5%	1%	2%	Valor <i>p</i>
<b>Sobrevivência</b>	$94,38 \pm 2,39$	$95,00 \pm 3,54$	$96,25 \pm 3,23$	$93,75 \pm 2,50$	0,636
<b>Peso inicial</b>	$2,89 \pm 0,02$	$2,89 \pm 0,01$	$2,89 \pm 0,02$	$2,90 \pm 0,01$	0,950
<b>Peso final</b>	$14,11 \pm 0,35$	$13,98 \pm 0,29$	$13,66 \pm 0,24$	$13,78 \pm 0,23$	0,154
<b>GPS</b>	$1,87 \pm 0,55$	$1,76 \pm 0,60$	$1,81 \pm 0,57$	$1,85 \pm 0,49$	0,988
<b>GPT</b>	$11,22 \pm 0,37$	$11,09 \pm 0,30$	$10,77 \pm 0,23$	$10,89 \pm 0,23$	0,166
<b>FCA</b>	$1,57 \pm 0,07$	$1,68 \pm 0,10$	$1,65 \pm 0,09$	$1,66 \pm 0,07$	0,311

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão das quadruplicatas. GPT: ganho de peso total; GPS: ganho de peso semanal; FCA: fator de conversão alimentar.

#### *Parâmetros hemato-imunológicos*

Não foi possível observar diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos em nenhum dos parâmetros imunológicos analisados, como concentração total de proteínas do soro, atividade da fenoloxidase (PO) e capacidade aglutinante do soro.

**Tabela 7.** Parâmetros imunológicos do *L. vannamei* alimentados com dietas contendo a macroalga *U. ohnoi* em diferentes níveis (0,5%, 1%, 2%) e dieta controle (sem suplementação).

Tratamentos	Controle	0,5%	1%	2%	Valor <i>p</i>
<b>Título de aglutinação (<math>\log_2 x+1</math>)</b>	$10 \pm 0,00$	$9,43 \pm 0,51$	$10 \pm 0,00$	$10,35 \pm 0,00$	0,1628
<b>Atividade da PO absoluta (unidade <math>\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}</math> proteína)</b>	$10,17 \pm 0,96$	$9,58 \pm 3,19$	$12,25 \pm 3,98$	$13,02 \pm 2,29$	0,3484

---

<b>Concentração proteica (mg mL<sup>-1</sup>)</b>	206,11±21,85	204,43±49,11	202,45±32,12	189,11±13,3 5	0,5848
---	--------------	--------------	--------------	------------------	--------

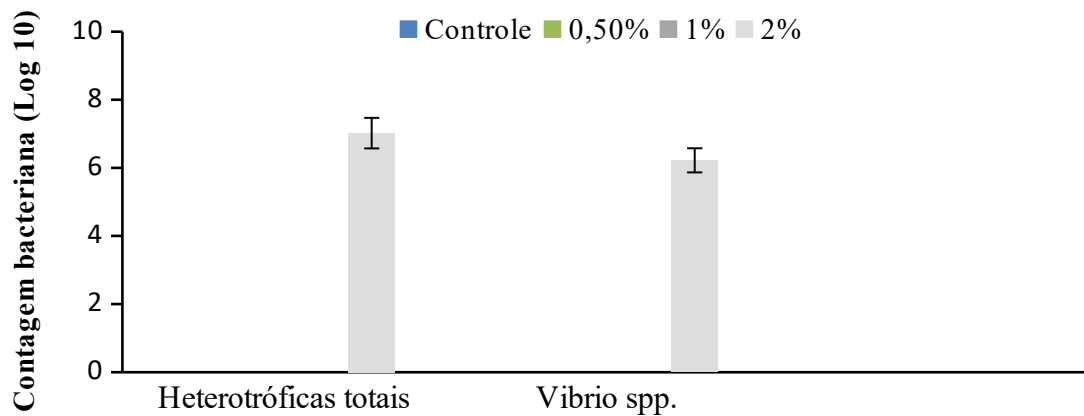
---

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão das quadruplicatas. PO: fenoloxidase.

*Contagem bacteriológica do trato intestinal*

A contagem de bactérias do trato intestinal do *L. vannamei* alimentados com dietas suplementadas e uma dieta controle não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), conforme Figura 5.

**Figura 5.** Contagem de bactérias do trato intestinal do *L. vannamei* alimentados com dietas contendo a macroalga *U. ohnoi* em diferentes níveis (0,5%, 1%, 2%) e dieta controle (sem suplementação).

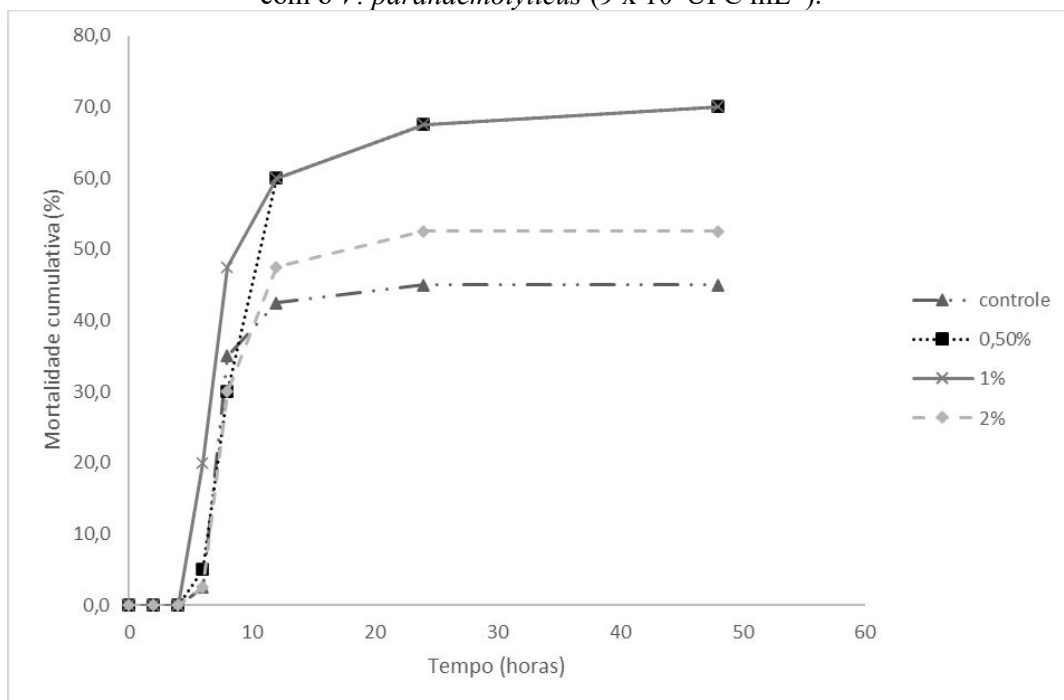


Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão das quadruplicatas e as barras indicam o desvio padrão da média. Heterotróficas totais  $p= 0,801$ . *Vibrio* spp.  $p= 0,210$ .

#### Desafio experimental com *Vibrio parahaemolyticus*

Após 48h de monitoramento, não houve diferença significativa na mortalidade entre os tratamentos, conforme demonstrado na figura 6.

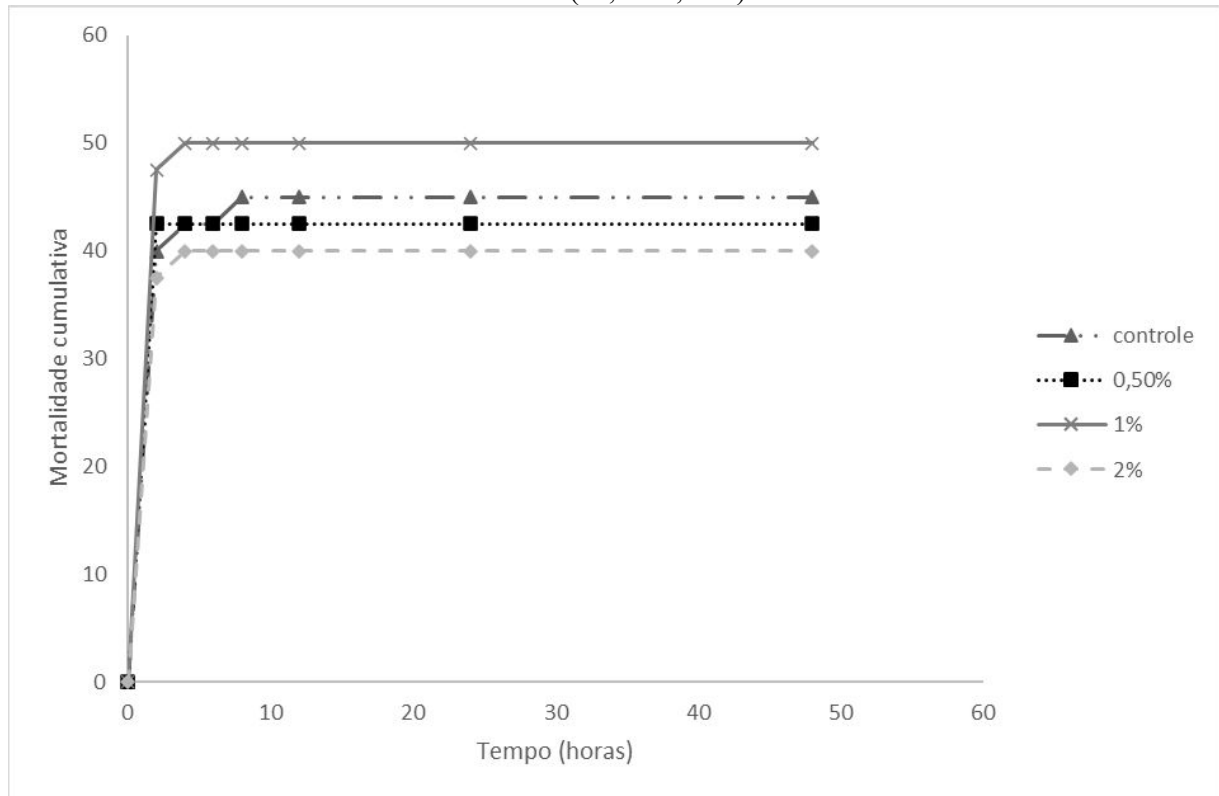
**Figura 6.** Mortalidade cumulativa de *L. vannamei* alimentados com dietas contendo a macroalga *U. ohnoi* em diferentes níveis (0,5%, 1%, 2%) e dieta controle (sem suplementação após 48 h do desafio com o *V. parahaemolyticus* ( $9 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>)).



### Choque térmico

Após 48h de monitoramento, não houve diferença significativa entre os tratamentos, conforme demonstrado na figura 7.

**Figura 7.** Mortalidade cumulativa do *L. vannamei* alimentados com dietas contendo a macroalga *U. ohnoi* em níveis diferentes (0,5%, 1%, 2%) e dieta controle (sem suplementação) após o choque térmico ( $11,7 \pm 0,1$  °C).



### 3.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, a suplementação com a *U. ohnoi* na dieta dos camarões não demonstrou diferenças significativas nos parâmetros zootécnicos quando comparado ao tratamento controle. Apesar disso, efeitos negativos também não foram detectados, sendo possível observar crescimento semanal satisfatório para a espécie, bem como valores de FCA e sobrevivência. Uma das razões para explicar a ausência de diferenças significativas pode estar relacionada ao nível de inclusão da macroalga, que pode ter sido baixo para apresentar diferença estatística quando comparada com a ração controle ou a necessidade de ampliar o período experimental. Mangott *et al.* (2020), que incluíram 4% da *U. lactuca* na dieta de *L. vannamei* por 6 semanas em sistema de recirculação (RAS) e demonstraram aumento na taxa de crescimento específico ( $4.92 \pm 0.4\%$  day<sup>-1</sup>) em comparação com a dieta controle ( $2.41 \pm 0.3\%$  day<sup>-1</sup>). O mesmo efeito positivo foi relatado por Yanthong;

Ruensirikulb (2020), que ao suplementarem diferentes níveis (5 e 10%) da *Ulva* sp. demonstraram benefício no crescimento e desempenho do peixe *Scatophagus argus* quando comparada com a alimentação controle. Os mesmos autores afirmam que 5-10% de substituição dietética de *Ulva* sp. seria o ideal para obter melhorias no desempenho de crescimento e utilização na ração.

Alguns componentes específicos da *Ulva* sp. parecem afetar positivamente a saúde do camarão. O polissacarídeo ulvana, que se destaca por atuar como prebiótico, pode estimular o crescimento de bactérias benéficas no trato intestinal dos animais (VIDHYA HINDU *et al.*, 2019; WIJESEKARA *et al.*, 2011) e ter efeitos positivos sobre o sistema imunológico dos organismos aquáticos (PESO-EHARRI *et al.*, 2012). Hongxing *et al.* (2019) avaliaram o efeito imunoestimulante dos polissacarídeos de *Ulva prolifera* administrados por via oral em camarões brancos e sugeriram que estes polissacarídeos promovem o crescimento, aumento da resistência imunológica e à doença contra *V. parahaemolyticus* em *L. vannamei*. Akbary; Aminikhoei (2018) suplementaram com o extrato da *U. rigida* o camarão branco por 8 semanas e observaram melhor resistência após serem desafiados com *Photobacterium damsela* (vibrionaceae). No presente trabalho não foram observadas diferenças significativas entre o controle e os tratamentos com inclusão da *U. ohnoi* no desafio com o *Vibrio parahaemolyticus* em concentração de  $9 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Apesar de não apresentar diferenças estatísticas, pode-se observar que os animais do tratamento 2% obtiveram resultados semelhantes ao tratamento controle (sobrevivência de 47,5% a 52,5% respectivamente), com uma tendência a maior resistência ao desafio que os tratamentos 0,5% e 1% (sobrevivência de 30% a 35%).

Não foram observadas diferenças estatísticas sobre os parâmetros imunológicos e quantificação de bactérias heterotróficas totais e vibrionaceas nos camarões. Apesar da macroalga utilizada neste experimento possuir um alto teor do polissacarídeo ulvana (75% a mais de concentração devido ao seu cultivo em bioflocos), o nível de inclusão na dieta não foi suficiente para mostrar melhoria no sistema imunológico e diferença na contagem bacteriana dos camarões quando comparada com o controle e os tratamentos com inclusão da alga. Fumanal *et al.* (2020), sugerem que o efeito específico é diferente para cada espécie de animal e o nível de inclusão algal influencia no resultado experimental. Contudo, os valores apresentados para os parâmetros imunológicos estão de acordo com Coelho *et al.* (2021) para a espécie em cultivo de água clara.

Sabe-se que as alterações de temperatura e o estresse podem afetar consideravelmente o equilíbrio fisiológico dos organismos aquáticos, alterando

consequentemente seu sistema imune (SANTOS *et al.*, 2013). As baixas temperaturas podem causar imunodepressão nos animais afetados, aumentando assim a vulnerabilidade a agentes patogênicos (GOMEZ-JIMENEZ *et al.*, 2000; KAUTSKY *et al.*, 2000; WANG; CHEN, 2007). O frio também pode modificar o metabolismo energético dos crustáceos, além das proporções de ácidos graxos saturados, levando a um rápido aumento na proporção de ácidos graxos insaturados, afetando a fluidez da membrana, reduzindo a osmolaridade da hemolinfa e a coordenação neuro-muscular, ocasionando a morte do animal (AZHAYWARD *et al.*, 2014; AZRA *et al.*, 2020a, b; HERMES-LIMA *et al.*, 2015; PRUITT, 1990; QIU *et al.*, 2011; REN *et al.*, 2020).

Schleder *et al.* (2017), relatou sobre essa alteração na membrana celular provocada pelo frio, que ao adicionarem a alga parda *Sargassum filipendula* (0,5%) na dieta do *L. vannamei*, observaram o aumento dos fosfolipídios poli-insaturados, o que pode melhorar a fluidez da membrana e das defesas microbianas. Legarda *et al.* (2021), observaram aumento de 49% do ácido docosahexaenóico (DHA) no tecido muscular do peixe *Seriola dorsalis*, após suplementá-lo com 10 g kg<sup>-1</sup> da macroalga *U. fasciata*. No presente estudo, a mortalidade após o choque térmico ficou entre 40-50%, sendo que o tratamento 2% apresentaram a menor mortalidade cumulativa, apesar de não apresentar diferença estatística com o grupo controle. Todas as mortalidades ocorreram nas primeiras horas, ao longo do processo de flutuação térmica (1-7h h.p.i.), em todos os grupos. Pesquisas sugerem que a inclusão de algas na dieta dos animais pode gerar um aumento dos ácidos graxos insaturados, que interferem no aumento da fluidez da membrana, explicando em parte, a resistência dos animais ao choque térmico (REZENDE *et al.*, 2021; SCHLEDER *et al.*, 2017a). Contudo, apesar dos compostos bioativos presentes na *U. ohnoi*, o nível de inclusão na dieta destes animais não foi suficiente para causar efeitos positivos na resistência ao choque térmico.

### 3.5 CONCLUSÃO

A inclusão da *U. ohnoi* na dieta do camarão-branco-do-pacífico em taxas de 0,5, 1 e 2% não foi suficiente para melhorar significativamente a resistência dos camarões sobre os parâmetros zootécnicos, imunológicos, quantificação de bactérias heterotróficas totais e vibriônica, choque térmico e desafio com *V. parahaemolyticus*.

### 3.6 REFERÊNCIAS

AZRA, M. N. *et al.* Effects of climate-induced water temperature changes on the life history of brachyuran crabs. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 1211–1216, 2020a.



- AZRA, M. N. *et al.* Growth rate and fatty acid composition of orange mud crab instars, *Scylla olivacea*, reared at different temperatures. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 46, n. 1, p. 97–102, 2020b.
- AKBARY, P.; AMINIKHOEI, Z. Effect of polysaccharides extracts of algae *Ulva rigida* on growth, antioxidant, immune response and resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei* against *Photobacterium damsela*. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 7, p. 2503–2510, 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BURRIDGE, L. *et al.* Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, v. 306, n. 1–4, p. 7–23, 2010.
- COELHO, J. R. *et al.* In vitro antimicrobial activity of carvacrol against shrimp pathogens and its use as feed additive for the pacific white shrimp. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 47, p. e645, 2021.
- COLLÉN, P.N. *et al.* Ulvan Lyases Isolated from the Flavobacteria *Persicivirga ulvanivorans* Are the first Members of a New Polysaccharide Lyase Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 42063–42071, 2011.
- COSTA, L.S. *et al.* Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21–28, 2010.
- CRUZ-SUÁREZ, L. E. *et al.* Shrimp/*Ulva* co-culture: a sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. **Aquaculture**, v. 301, n. 1–4, p. 64–68, 2010.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO. The State of Food Security and Nutrition in the World 2020. Transforming food systems for affordable healthy diets. Roma, FAO. 2020.
- FUMANAL, M. *et al.* Inclusion of dietary *Ulva ohnoi* 5% modulates *Solea senegalensis* immune response during *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infection. **Fish & shellfish immunology**, 100, 186–197, 2020.
- GLASSON, C.R.K. *et al.* A cascading biorefinery process targeting sulfated polysaccharides (ulvan) from *Ulva ohnoi*. **Algal Research**, v. 27, p. 383–391, 2017.
- GOMEZ-JIMENEZ, S.; UGLOW, R.F.; GOLLAS-GALVAN, T. The effects of cooling and emersion on total haemocyte count and phenoloxidase activity of the spiny lobster *Panulirus interruptus*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 10, p. 631–635, 2000.
- GONG, H. *et al.* Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. **Aquaculture**, v. 190, n. 3–4, p. 305–324, 2000.
- GUERRELHAS, ACB; TEIXEIRA, APG; GODOY, E. Cultivo intensivo: Pode ser a solução para o aumento da produção da carcinicultura. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 21, n. 123, p. 52–57, 2011.

- VALENTE, L *et al.* Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 252, n. 1, p. 85–91, 2006.
- HAMED, I. *et al.* Marine bioactive compounds and their health benefits: a review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 14, n.4, p. 446-465, 2015.
- HAYWARD, S. A. L.; MANSO, B.; COSSINS, A. R. Molecular basis of chill resistance adaptations in poikilothermic animals. **The Journal of Experimental Biology**, n.217, p. 6-15, 2014.
- HERMES-LIMA, M. *et al.* Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 1122-1143, 2015.
- HOLDT, S.L., KRAAN, S. Compostos bioativos em algas marinhas: aplicações e legislação de alimentos funcionais. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 543–597, 2011.
- HONGXING, *et al.* Effects of short period feeding polysaccharides from marine macroalga, *Ulva prolifera* on growth and resistance of *Litopenaeus vannamei* against *vibrio parahaemolyticus* infection. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, p. 2085–2092, 2019.
- NIU J. *et al.* Comparison and evaluation of four species of macro-algae as dietary ingredients in *Litopenaeus vannamei* under normal rearing and WSSV challenge conditions: effect on growth, immune response, and intestinal microbiota. **Frontiers in Physiology**, v. 9. p. 1880, 2019.
- KAUTSKY, N. *et al.* Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v.191, p.145-161, 2020.
- LEGARDA, E. C. *et al.* Effects on fatty acids profile of *Seriola dorsalis* muscle tissue fed diets supplemented with different levels of *Ulva fasciata* from an Integration Multi-Trophic Aquaculture system. **Aquaculture**, v. 535, 736414, 2021.
- LIGHTNER, DV. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 1, p. 110-130, 2011.
- MAGGIONI, D.G. *et al.* Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immune stimulation. **Aquaculture**, v. 241, p.501- 515, 2004.
- MANGOTT, A. *et al.* *Ulva lactuca* as a functional ingredient and water bioremediator positively influences the hepatopancreas and water microbiota in the rearing of *Litopenaeus vannamei*. **Algal Research**, v. 51, 102040, 2020.
- MASALÓ, I. *et al.* Influence of growing conditions on *Ulva ohnoi* composition cultivated in an IMTA-RAS system, in: **Aquaculture Europe**, v.16, p. 6–8, 2016.
- MATA, L. *et al.* The intensive land-based production of the green seaweeds *Derbesia tenuissima* and *Ulva ohnoi*: biomass and bioproducts. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 365–375, 2016.

- NIU, J. *et al.* Effects of different levels of dietary wakame (*Undaria pinnatifida*) on growth, immunity and intestinal structure of juvenile *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 435, p. 78-85, 2015.
- NRC - National Research Council. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Washington, D. C.: The National Academies Press, 2011.
- PESO-ECHARRI, P. *et al.* Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: alginato, carragenato y ulvano. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 47, n. 3, p.373-381, 2012.
- PRUITT, N.L. Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea: membrane structure and metabolism. **Journal of Thermal Biology**, v. 15, p. 1-8, 1990.
- QI, H. *et al.* Synthesis and antihyperlipidemic activity of acetylated derivative of ulvan from *Ulva pertusa*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 50, p. 270-272, 2011.
- QIU, J. *et al.* Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 154, p. 36-41, 2011.
- RAY, A. J. *et al.* Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. **Aquaculture**, v. 299, n. 1-4, p. 89-98, 2010.
- REN, X. *et al.* Integrated transcriptomic and metabolomic responses in the hepatopancreas of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) under cold stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 111360, 2020.
- REZENDE, P. C. *et al.* Brown seaweeds added in the diet improved the response to thermal shock and reduced *Vibrio* spp. in pacific white shrimp post-larvae reared in a biofloc system. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 6, p. 2852-2861, 2021.
- SANTOS, R. N. *et al.* A Brief History of White spot syndrome virus and its epidemiology in Brazil. 2013. Disponível em: <http://repositorio.furg.br/xmlui/bitstream/handle/1/5912/63-254-1-PB.pdf?sequence=1>. Acesso: 01 de nov. 2022
- SCHLEDER, D.D. *et al.* Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 2471-2477, 2017a.
- SHAHAR B; GUTTMAN L. An integrated, two-step biofiltration system with *Ulva fasciata* for sequenced removal of ammonia and nitrate in mariculture effluents. **Algal Research**, v. 52, p. 102-120, 2020.
- SÖDERHÄLL, K.; HÄLL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **BBA - General Subjects**, v. 797, n. 1, p. 99-69, 1984.
- STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. A Practical Handbook of Seawater Analysis. A practical handbook of seawater analysis, v. 167, p. 185, 1972.

VAN WYK, P.; SCARPA, J. Water Quality Requirements and Management. In: Van Wyk, P. et al. (Eds.). *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Florida: Department of Agriculture and Consumer Services, p. 141–162, 1999.

VATSOS, I. N.; REBOURS, C. Seaweed extracts as antimicrobial agents in aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 2017–2035, 2015.

VIDHYA HINDU, S. *et al.* A review on the impact of seaweed polysaccharide on the growth of probiotic bacteria and its application in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 27, n. 1, p. 227–238, 2019.

WANG, F.I.; CHEN, J.C. 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, 2007.

WANG, Q. *et al.* One health pathogen surveillance demonstrated the dissemination of gut pathogens within the two coastal regions associated with intensive farming. **Gut Pathogens**, v.1, n. 1, p. 1–16, 2021.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v.84, n.1, p.14–21, 2011.

WONG, K.H.; CHEUNG P.C. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds I. proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. **Food Chemistry**, v.71, p.475- 482, 2000.

YANGTHONG, M.; RUENSIRIKUL, J. Feed intake stimulation of juvenile spotted scat (*Scatophagus argus* Linnaeus, 1766) using dietary seaweeds supplementation (*Ulva* sp.). **Aquaculture**, v. 529, 735626, 2020.

ZHANG, C., LI, X., KIM, S. Application of marine biomaterials for nutraceuticals and functional foods. **Food Science Biotechnology**, v. 21, p. 625–631, 2012.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O cultivo da *U. ohnoi* em bioflocos aumenta a produtividade de ulvana e proteína;
- Os carotenoides da *U. ohnoi* diminuíram no final do cultivo em bioflocos;
- A inclusão da *U. ohnoi* não demonstrou proteção contra a infecção causada por *V. Parahaemolyticus*;
- O uso da macroalga na dieta do *L. vannamei* não exerceu nenhum efeito sinérgico ou antagônico no desempenho zootécnico, imunológico e microbiológico dos animais.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ALGAS VERDES (2012). Algas verdes: o que caracteriza? Disponível em: <http://www.dbi.uem.br/algas-verdes.pdf> . Acesso em: 07 jan. 2023.

AVNIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, n. 3, p. 227-235, 1999.

BRAGA, A., *et al.* The effects of feeding commercial feed formulated for semi-intensive systems on *Litopenaeus Vannamei* production and its profitability in a hyper-intensive biofloc-dominated system. **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 172–177, 2016.

BRODIE, J. A., MAGGS C., JOHN, D.M. Green seaweeds of Britain na Ireland. – **British Phycological Society**, p. 242, 2007.

BUSCHMANN, A. H., *et al.* Seaweed production: overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity. **European Journal of Phycology**, v. 52, n. 4, p. 391-406, 2017.

CHÁVEZ-SÁNCHEZ, T., *et al.* First report, along with nomenclature adjustments, of *Ulva ohnoi*, *U. tépida* and *U. torta* (Ulvaceae, Ulvales, Chlorophyta) from Northwestern Mexico. **Botanica Marina**, v. 62, p. 113-123, 2019.

CHOPIN, T., *et al.* Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. **Journal of Phycology**, v. 37, p. 975–986, 2001.

DEB, S., NOORI, M.T., RAO, P.S. Experimental study to evaluate the efficacy of locally available waste carbon sources on aquaculture water quality management using biofloc technology. **Aquaculture International**, v. 25, p. 2149–2159, 2017.

DENIS, C. *et al.* Study of Chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* Brittany (France). **Food Chemistry**, n.3, v.19, p. 913-917, 2010.

EMERENCIANO, M., GAXIOLA, G., CUZON, G. in: M.D. Matovic (Ed.), *Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry, Biomass Now - Cultivation and Utilization*, 2013. IntechOpen.

EVANS, F., LANGDON, C.J. Co-culture of dulse *Palmaria mollis* and red abalone *Haliotis rufescens* under limited flow conditions. **Aquaculture**, v. 185, p. 137–158, 2000.

FAO. 2022. FAO publications catalogue 2022- October. Rome.

FERNANDEZ-DIAZ C., COSTE O., MALTA E.-J. Polymer chitosan nanoparticles functionalized with *Ulva ohnoi* extracts boost in vitro ulvan immunostimulant effect in *Solea senegalensis* macrophages. **Algal Research**, v. 26, p.135–142, 2017.

FLEURENCE, J. Seaweed proteins: biochemical nutritional aspects and potential uses. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 25–28. 1999.

GARSON, J. Marine natural products. **Natural Products Report**, v. 6, p. 143–170, 1989.

- GRAHAM, J. E., GRAHAM, L.E., WILCOX, L.W. *Algae*, 2 ed. Pearson, 2008.
- GUIRY, M.D., GUIRY, G.M., 2019. AlgaeBase [WWW Document]. Natl. Univ. Ireland, Galway. URL <http://www.algaebase.org> (accessed 10.11.22).
- HARRISON, P.J., HURD, C.L. Nutrient physiology of seaweeds: application of concepts to aquaculture. **Cahiers Biologie Marine**, v. 42, p. 71–82, 2001.
- HAYDEN, H.S. *et al.* Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. **European Journal of Phycology**, v. 38, p. 277–294, 2003.
- HIRAOKA, M. (2004) '*Ulva ohnoi*', CABI Compendium. CABI International. doi: 10.1079/cabicompndium.109162.
- HOLDT, S. L.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 543–597, 2011.
- IVANOVA, V., *et al.* Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 83-97, 1994.
- KANG, E. J., *et al.* Evaluating bloom potential of the green-tide forming alga *Ulva ohnoi* under ocean acidification and warming. **Science of The Total Environment**, n. 769, 144443, 2021.
- KUMAR, M., *et al.* Assessment of nutrient composition and antioxidant potential of Caulerpaceae seaweeds. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, n.2, p. 270-278, 2011.
- LAHAYE, M., ROBIC, A. Structure and functional properties of Ulvan, polysaccharide from green seaweed. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1765–1774, 2007.
- LANARI, M., COPERTINO, M. Drift macroalgae in the Patos Lagoon Estuary (southern Brazil): effects of climate, hydrology and wind action on the onset and magnitude of blooms. **Marine Biology Research**, v. 13, p. 36–47, 2017.
- LARGO, D.B., *et al.* Taxonomic and ecological profile of 'green tide' species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) in central Philippines. **Hydrobiologia**, v.512, p.247-253, 2004.
- LOBBAN, C. S.; HARRISON, P. J. Light and Photosynthesis. *Seaweed Ecology and Physiology*, Cambridge University Press: USA, v. 4, 1997a.
- MABEAU, S. FLEURENCE, J. Seaweed in food products: Biochemical and nutritional aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 4, p. 103–107, 1993.
- MAGALLANES, C., CORDOVA, C., OROZCO, R. Antibacterial activity of ethanolic extracts of marine algae from central coast of Peru. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n. 2, p. 125-132, 2003.
- MARINHO-SORIANO, E.; CARNEIRO, M.A.A. Macroalgas marinhas: biologia, ecologia e importância econômica. In: Danielle de Lima Viana; Jorge Eduardo Lins Oliveira; Fábio Hissa Vieira Hazin; Marco Antonio Carvalho de Souza. (Org.). **Ciências do Mar**, v. 2 (1), p. 66-119, 2021.

- MCHUGH, D., 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries, Technical Paper N° 441. FAO, Rome, Italy.
- MELTON, J., *et al.* Molecular identification and nutrient analysis of the green tide species *Ulva ohnoi* M. Hiraoka & S. Shimada, 2004 (Ulvophyceae, Chlorophyta), a new report and likely nonnative species in the Gulf of Mexico and Atlantic Florida, USA. **Aquatic Invasions**, v. 11, n. 3, p. 225–237, 2016a.
- MENDES, G. N. E.; PEDRESCHI, O. Aclimação de juvenis de *Litopenaeus vannamei* à água doce. In: I Congresso Sul-Americano de Aquicultura: Recife, 735, 1998.
- MILADI, M.A. *et al.* A DNA barcoding survey of *Ulva* (Chlorophyta) in Tunisia and Italy reveals the presence of the overlooked alien *U. ohnoi*. **Cryptogamie Algologie**, v. 39, n.1, p. 85-107, 2018.
- MORAIS, T. *et al.* Seaweed potential in the animal feed: A review. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 8, n. 8, p. 559, 2020.
- NEORI, A., *et al.* Seaweed biofilters as regulators of water quality in integrated fish-seaweed culture units. **Aquaculture**, v. 141, p. 183–199, 1996.
- NEORI, A., *et al.* A novel three-stage seaweed (*Ulva lactuca*) biofilter design for integrated mariculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 543–553, 2003.
- NEORI, A., RAGG, N.L.C., SHPIGEL, M. The integrated culture of abalone, seaweed, fish and clams in a modular intensive land-based system: II performance and nitrogen partitioning within an abalone (*Haliotis tuberculata*) and macroalgae culture system. **Aquaculture Engineering**, v. 17, p. 215–239, 1998.
- NEORI, A., SHPIGEL, M., BEN-EZRA, D. A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. **Aquaculture**, v. 186, p. 279–291, 2000.
- NETTO, S.A., *et al.* Benthic Estuarine Assemblages from the Southern Brazilian Marine Ecoregion, in: Lana, P. da C., Bernardino, A.F. (Eds.), Brazilian Marine Biodiversity. **Springer International Publishing**, p. 177–212, 2018.
- OHNO, M. *Ulva* as New Food Stuff in Utilization of *Ulva* spp. and Environmental Restoration (ed. Notoya, M.) p.137–143, 1999.
- OLIVEIRA, E.C. Algas marinhas: um recurso ainda pouco explorado pelo Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 6, n. 7, p. 24-26, 1997.
- PEIXOTO, M. J., *et al.* Effects of dietary supplementation of *Gracilaria* sp. extracts on fillet quality, oxidative stress, and immune responses in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 1, p. 761-770, 2019.
- PEÑA-RODRIGUEZ, A., *et al.* Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 491-498, 2011.
- RANDALL, D.J., TSUI, T.K.N. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 17–23, 2002.



- ROBIC, A. Seasonal variability of physico-chemical and rheological properties of ulvan in two *Ulva* species (Chlorophyta) from the Brittany coast. **Journal of Phycology**, v. 45, p. 962–973, 2009.
- ROLEDA, M.Y., HURD, C.L. Seaweed nutrient physiology: application of concepts to aquaculture and bioremediation. **Phycologia**, v. 58, p. 552–562, 2019.
- ROSAS, C., et al. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption, ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 234, p. 41–57, 1999.
- RYU, B. H., et al. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 21, p. 595–600, 1989.
- SAMOCHA, T., et al. Growth and nutrient uptake of the macroalga *Gracilaria tikvahiae* cultured with the shrimp *Litopenaeus vannamei* in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system. **Aquaculture**, v. 446, n. 1, p. 263–271, 2015.
- SCHLEDER, D. D. et al. Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. *Journal of Applied Phycology*, p. 2471–2477, 2017a.
- SHPIGEL, M., et al. *Ulva lactuca* from an integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) biofilter system as a protein supplement in gilthead seabream (*Sparus aurata*) diet. **Aquaculture**, v. 481, p. 112–118, 2017.
- SOLTANI, S., et al. Antioxidant and antibacterial activities of *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. in Caspian Sea Coast, Iran, African. **Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 39, p. 7684–7689, 2011.
- STÉVANT, P.; REBOURS, C.; CHAPMAN, A. Seaweed aquaculture in Norway: recent industrial developments and future perspectives. **Aquaculture International**, v. 25, p. 1373–1390, 2017.
- THURSTON, R.V.; RUSSO, R.C. Acute toxicity of ammonia to rainbow trout. *T. Am. Fish. Soc.* 112, 696–704, 1983.
- VAIRAPPAN, C.S. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Biomology Engineering*, 20, p. 255–259, 2003.
- VALENTE, L. M. P., et al. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 252, n. 1, p. 85–91, 2006.
- VALENTE, L. M. P., et al. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 252, n. 1, p. 85–91, 2006.
- VASCONCELOS, B.M.F.; GONCALVES, A.A. Macroalgas e seus usos – alternativas para as indústrias brasileiras. **Revista Verde**, v. 8, n. 5, p. 125 - 140, 2013.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p.139-145, 2004.

YANG, H., et al. Metabolic characteristics of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) during aestivation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 330, p. 505–510, 2006.