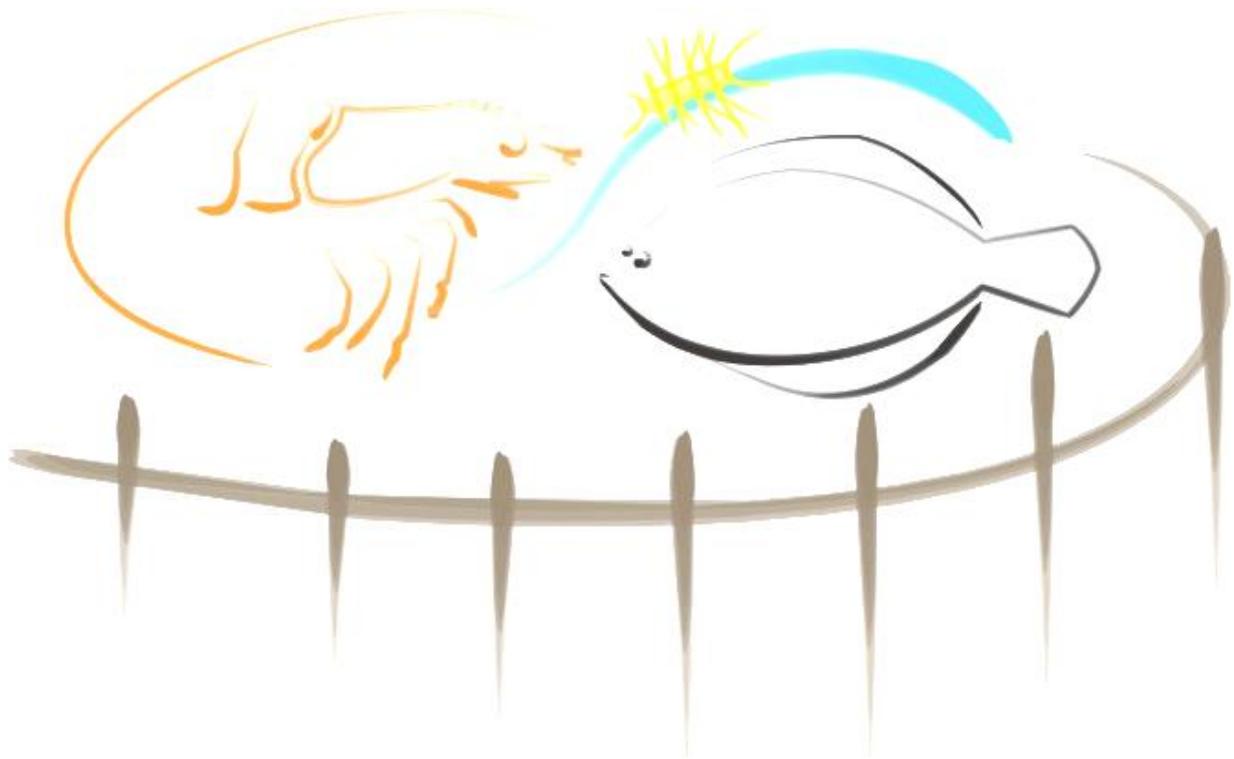


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**



Substituição da farinha de peixe pela cianobactéria (*Arthrospira platensis*) na formulação de dietas para *Litopenaeus vannamei*

Joaquin Macias Sancho

**FURG
RIO GRANDE, RS
2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Substituição da farinha de peixe pela cianobactéria (*Arthrospira platensis*)
na formulação de dietas para *Litopenaeus vannamei*

Joaquin Macias Sancho

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

Aluno: Joaquin Macias Sancho

Orientador: Dr. Luis Henrique da Silva Poersch

Co-orientador: Dr. Marcelo Borges Tesser

RIO GRANDE, RS, BRASIL.

AGOSTO, 2013.

Sumário

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Introdução geral.....	7
Crescimento da aquicultura marinha.....	7
Pesca e utilização dos recursos pesqueiros.....	8
Alternativas para a farinha de peixe na formulação de dietas para camarões.....	9
História e características de <i>Arthrospira platensis</i>	11
Sistema imunológico de <i>Litopenaeus vannamei</i>	12
Objetivo.....	14
Referências bibliográficas.....	15
Artigo Anexo.....	20
Resumo.....	21
Abstract.....	22
Introdução.....	23
Material e Métodos.....	25
Resultados.....	29
Discussão.....	32
Conclusão.....	35
Referências Bibliográficas.....	36

AGRADECIMENTOS

Ao Brasil por me brindar essa oportunidade.

A CAPES e a CNPq por me financiar durante o curso de pós-graduação.

Aos meus pais por me ajudarem a conseguir que meu ânimo estivesse sempre lá acima.

As minhas irmãs, Maribel e Margarita, por todo o apoio administrado durante as poucas, mas inesquecíveis conversas à distância.

Ao Skype por me permitir essas comunicações com o outro lado do charco.

Aos meus tios, primos, sobrinho... Por acreditarem sempre no meu trabalho.

Ao Dr. “Mineiro”, por me orientar, aconselhar profissionalmente e pessoalmente e ter tanta paciência e confiança durante esse processo de maturação tanto acadêmica quanto pessoal.

Ao Dr. Tesser, meu co-orientador que tanto me exigiu, mas soube fazer que aprendesse querer minha pessoa e também foi de grande ajuda na finalização desse trabalho.

Dr. Romano por entregar sabedoria, conhecimentos profissionais e da mesma vida.

Ao Dr. “Mano” pela ajuda, experiências profissionais, pessoais e na consecução de este título.

Dr. Prentice pelo apoio pessoal e científico.

Os funcionários da EMA, Alessandro, Anderson, Pilenghi, Sandro, “Seu” Hermes, sem esquecer de todos os vigilantes e faxineiras pelo apoio no dia-a-dia de trabalho.

A Sú, por me permitir desabafar no ombro, correções, experiências e puxadas de orelha para me trazer de volta na realidade.

Msc. Bauer por ser colega e amigo durante a elaboração do artigo e o experimento.

A todos os colegas e amigos da EMA e da FURG, incontáveis os nomes, mas todos os presentes em minha vida. (Juan, Leo, Sabrina, Augusto, Angélica, Plínio, Adriana, Julio, João, Gabi, Barbara, Camu, Fabi, Carlos, Bruno, Virginia, Marta, Janaina, Ricardo, Oka... em fim todos os colegas).

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

E agradecer também todos os amigos de Cassino.

RESUMO

O desenvolvimento da aquicultura está diretamente relacionado ao crescimento populacional e à estagnação da pesca. Mais de 30 milhões de toneladas de recursos pesqueiros são utilizados para a obtenção de óleo e farinha de pescado (FP), sendo estas as principais fontes de proteína utilizada na formulação de rações na aquicultura. Os preços destes ingredientes vêm aumentando nos últimos anos devido ao crescimento da aquicultura e diminuição dos estoques de espécies forrageiras. Diversos estudos buscam ingredientes alternativos à FP que possam ser utilizados na formulação de dietas para alimentar organismos aquáticos e assim diminuir a dependência da aquicultura sobre a pesca. Com este intuito foram formuladas cinco rações com diferentes percentuais de substituição de FP por farinha da cianobactéria *Arthrospira platensis* (0%, 25%, 50%, 75% e 100%) para alimentar camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* e assim testar os efeitos no desenvolvimento zootécnico e a resposta imunológica desta espécie. O estudo foi realizado na Estação Marinha de Aquicultura (EMA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os resultados obtidos neste trabalho foram analisados estatisticamente com teste ANOVA de uma via e quando houve diferenças estatísticas as médias foram contrastadas por meio do teste de Newman-Keuls, todos ao nível de 5% de significância. Não houve diferenças significativas para o ganho em peso entre os camarões dos tratamentos de substituição de 0% até 75%, no entanto apresentou diferenças estatísticas nos diferentes parâmetros hemato-imunológicos, tanto no número de hemócitos (granulosos e hialinos) a partir de 25% de inclusão de cianobactéria. Foram obtidos menores valores no índice apoptótico apresentando diferenças estatísticas significativas para o tratamento 100% de substituição de FP pela cianobactéria *Arthrospira platensis*.

Palavras - chave: *Arthrospira platensis*, ganho em peso, resposta imunológica.

ABSTRACT

Aquaculture development is directly related to population growth and stagnation of fisheries. Over 30 million tons of fish resources are used to obtain oil and fish meal (FM), which are the main sources of protein used in the formulation of feedstuffs in aquaculture. The prices of these ingredients have been increasing in recent years due to the aquaculture growth and the reduction of forage species stocks. Several studies are seeking for alternative ingredients to FM that can be used to formulate feeds for aquatic organisms and attempt to reduce dependence on fisheries aquaculture. For this purpose five diets were formulated with different percentages of FM replacement by cyanobacteria *Arthrospira platensis* (0%, 25%, 50%, 75% and 100%) for feeding shrimp *Litopenaeus vannamei*. The study was conducted at the Marine Station of Aquaculture (EMA) of the Federal University of Rio Grande (FURG). The results obtained in this challenge were statistically analyzed by one-way ANOVA and the Newman-Keuls test, all at 5% level of significance. There were no significant differences in weight gain among shrimps of substitution treatments of 0% to 75%, but haemato-immunological parameters showed statistical differences in the number of haemocytes (granular and hyaline) from 25% inclusion of cyanobacteria. Lower values were obtained in apoptotic index showing statistically significant differences for the treatment 100% replacement of FM by cyanobacteria *Arthrospira platensis*.

Keywords: *Arthrospira platensis*, immunology, weight gain.

INTRODUÇÃO

Crescimento da aquicultura e da carcinicultura marinha

Dados da FAO (2012) relatam que em 2009 a criação de espécies aquáticas em cativeiro gerou 55,1 milhões de toneladas, enquanto a pesca aportou 90 milhões de toneladas. Naquele ano, a produção da aquicultura representou 37,9 % da produção de pescado. Welch *et al.* (2010) estimaram que no ano de 2030, a produção de pescados oriundos da aquicultura alcançará 65% da produção mundial.

O *Litopenaeus vannamei* é o crustáceo mais produzido no mundo, pois tolera amplias faixas de salinidade e temperatura, além de precisar dietas com menores níveis de proteína para obter melhores taxa de crescimento comparado à outros camarões (Briggs *et al.* 2004). Em 2010, o camarão branco *Litopenaeus vannamei* representou 71,8% da produção mundial de todas as espécies de camarões criados, sendo a Ásia o principal continente em termos de produção (77,9%), seguido pelo resto das Américas (12,1%) (FAO 2012). Nos últimos anos pesquisas desenvolveram novas técnicas de produção de camarões, como a utilização de sistemas com zero troca de água, o que permitiu aumentar os níveis de biossegurança, aproveitar a produtividade natural desse sistema e fornecer rações com menor porcentual de proteínas, tornando assim a atividade menos agressiva com o meio ambiente devido à redução na utilização da farinha de peixe (FP) (Wasielensky *et al.* 2006).

O crescimento da aquicultura tem influência direta na pesca. Isso ocorre porque a principal fonte de proteína utilizada para a formulação de dietas usadas na produção aquícola é a FP (FAO 2012). A utilização de farinha e óleo de peixes pela aquicultura é uma das objeções para atingir que a atividade seja mais sustentável (Boyd & Gautier 2000; Naylor *et al.* 2000; Boyd 2003).

Pesca e utilização dos recursos pesqueiros

O aumento da frota pesqueira nas últimas décadas e a maior eficiência das artes de pesca empregadas ampliou o esforço pesqueiro ocasionando o esgotamento dos recursos. Em 2009 a Comissão Europeia estimou que 88% dos estoques de peixes marinhos estão sobre explorados (Thurstan *et al.* 2010). A FAO (2012) afirma que dez espécies, as quais representam 30% da pesca mundial, estão totalmente sobre

exploradas. São sete representantes do Pacífico (*Engraulis japonicus*, *Engraulis mordax*, *Engraulis ringes*, *Scomber japonicus*, *Theragra chalcogramma*, *Trichiurus lepturus* e *Trachurus murphyi*) e três do Atlântico (*Clupea harengus*, *Micromesistius poutassou* e *Pollachius virens*).

As autoridades mundiais possuem conhecimento sobre as distintas medidas que devem ser assumidas para controlar os níveis de esforço pesqueiro e reduzir as pescarias de pequenos peixes pelágicos (PPP). É imperativo que sejam adotadas políticas para conseguir que as pescarias atinjam o estado sustentável, e inclusive possam recuperar o nível de indivíduos que existia na década de 1970, antes do decréscimo nos estoques pesqueiros (Pauly *et al.* 2002, Hilborn *et al.* 2005).

Segundo dados da FAO (2012), 128,3 milhões de toneladas da produção de pescado mundial foram utilizados para consumo humano, o restante (20,2 milhões de toneladas) foi utilizado para alimentação animal, 75% transformado em farinha e óleo de peixe. A aquicultura possui papel relevante no mercado da farinha e óleo de peixe devido que em 2007 consumiu 62% da produção de farinha de peixe (Merino *et al.* 2010). O mercado dos subprodutos de pescado resulta principalmente do processamento de PPP (Naylor *et al.* 2009, Merino *et al.* 2010). A sobre exploração dos PPP aumenta o preço dos subprodutos de peixe e tem efeito negativo nas espécies consideradas topo da cadeia alimentar marinha e conseqüentemente na disponibilidade das mesmas para o consumo humano (efeito “fishing down”).

A FAO menciona em seu relatório que há quase um bilhão de pessoas desnutridas no mundo (FAO 2012). A utilização dos subprodutos de pescado (FP e óleo de peixe) poderia ser uma alternativa para sanar parcialmente a fome, no entanto seria necessário diminuir a utilização dos subprodutos de pescado na formulação de rações para a aquicultura e outros animais e destiná-los para fabricação de alimentos para consumo humano. Um exemplo disto é o trabalho desenvolvido por Silva *et al.* (2012) que testaram a utilização da anchoita oriunda do extremo sul de Brasil como alternativa sustentável na alimentação escolar.

O avanço da aquicultura como fonte principal de pescado tem no uso da FP um dos maiores impedimentos devido ao alto custo e disponibilidade limitada deste ingrediente (Diana 2009). A diminuição das espécies utilizadas na obtenção de FP e a falta de substitutivos eficientes se torna item importante no mercado da aquicultura, dando aos produtores dos subprodutos de pescado vantagem para poder especular com o preço do ingrediente (Naylor *et al.* 2009).

Durante os anos de 2005 a 2008, os preços da farinha e do óleo de peixe aumentaram 50% e 130% respectivamente. Esse fato se deve ao aumento do consumo da farinha e óleo de peixe em decorrência do incremento da demanda (principalmente Ásia e América do Sul) e pela ocorrência dos eventos naturais cíclicos, como por exemplo, o *El Niño*, que afeta diretamente a disponibilidade desses ingredientes. A diminuição na pesca de anchova e o aumento na demanda de FP durante os anos 2010 e 2011 também provocou o aumento no preço da FP (Merino *et al.* 2010, FAO 2012). Assim, a procura de ingredientes alternativos torna-se importante para a evolução da aquicultura.

Alternativas para farinha de peixe na formulação de dietas para camarões

A FP é a principal fonte de proteína utilizada na formulação de rações comerciais para aquicultura (Kiron *et al.* 2012). Estudos demonstram a importância do uso da FP para a alimentação de camarões, por serem uma fonte de nutrientes essenciais, como aminoácidos, ácidos graxos altamente poli insaturados, fosfolipídios, colesterol e minerais (McIntosh 2000, Naylor *et al.* 2009, Tacon *et al.* 2011).

Dados sobre a utilização da farinha de peixe apontam que a indústria da aquicultura absorveu 53,2% de total de FP produzida (Naylor & Burke 2005; Tacon *et al.* 2006). Dentre os organismos produzidos pela aquicultura, a carcinocultura marinha foi a que mais consumiu FP (27,2% da produção total) na formulação de rações no ano 2008 (FAO 2012).

Diversos testes foram conduzidos quanto à possibilidade de substituição de FP por outros ingredientes nas dietas de *Litopenaeus vannamei*. Farinha de carne e ossos de frango (Forster *et al.* 2003), farinha de caranguejo vermelho (*Pleuroncodes planipes*) (Goytortúa-Bores *et al.* 2006), concentrado proteico de soja e de farinha de flocos microbianos (Bauer *et al.* 2012), concentrado proteico de arroz (Oujifard *et al.* 2012), a utilização de macroalgas como a *Gracilaria cervicornis* (Marinho-Soriano *et al.* 2007) e também o uso de rações preparadas com farelos procedente das microalgas *Haematococcus pluvialis* (Ju *et al.* 2012).

O avanço na aquicultura está permitindo a exploração de uma nova linha de ingredientes de origens vegetais terrestres e marinhos (Gatlin *et al.* 2007). Esses ingredientes são conhecidos como “alimentos ambientalmente amigáveis” com intuito de manter boa resposta no crescimento das espécies produzidas e menor impacto no

meio ambiente. Dentre esses ingredientes alternativos diferentes farelos de macroalgas e microalgas foram testados na dieta do camarão branco atingindo níveis de substituição entre 4% e 50% (Cruz-Suarez *et al.* 2000; Jaim-Ceballos *et al.* 2006; Marinho-Soriano *et al.* 2007; Hanel *et al.* 2007; Ju *et al.* 2012; Kiron *et al.* 2012). Cruz-Suárez *et al.* (2000), obtiveram melhores taxas de crescimento para *L. vannamei* quando alimentados com ração contendo 4% de farinha da alga kelp (*Macrocystis pyrifera*). Da mesma forma, Hanel *et al.* (2007) obtiveram bons resultados no crescimento de camarão branco. Os quais foram alimentados com ração que continha 44,7% de proteína bruta (mistura de ração para carpa de baixo conteúdo em FP e liofilizado de *Arthrospira platensis*). Marinho-Soriano *et al.* (2007) utilizando a alga *Gracilaria cervicornis* (Rodophyta) conseguiram bons níveis de crescimento para camarão branco quando se alterou a metade das proteínas da FP por proteínas provenientes da Rodophyta. Na pesquisa realizada por Kiron *et al.* (2012) atingiu-se níveis de 40% de substituição de FP por proteínas das microalgas do gênero *Nanofrustulum* (Bacillariophyceae) e *Tetraselmis* (Chlorophyceae) sem afetar o crescimento de *L. vannamei*. Ju *et al.* (2012) concluíram que a substituição de 50% de FP por farelo de microalga *Haematococcus pluvialis* não afeta o desenvolvimento do camarão *L. vannamei*

A substituição da farinha de peixe por outros ingredientes alternativos vai depender basicamente da natureza do ingrediente, animal ou vegetal e das características dos mesmos. A FP é a fonte de proteínas mais utilizada na formulação de dietas para aquicultura devido sua balanceada composição de aminoácidos essenciais e palatabilidade (Suárez *et al.* 2009; Terrazas-Fierro *et al.* 2010). A FP é uma fonte balanceada de aminoácidos essenciais, ácidos graxos poli insaturados essenciais de cadeia longa, tipo ômega-3 (ácido eicosapentaenoico, EPA; 20:5n-3), ácido docosaexaenóico (DHA; 22:6n-3) (Metian & Tacon 2009), e ômega-6 (ácido araquidônico; ARA; 20:4n-6), os quais estão ausentes nos principais alimentos alternativos testados até o momento. Segundo Suárez *et al.* (2009), encontramos até 90% menos ácidos graxos tipo n-3 em concentrado de soja do que na FP.

A cianobactéria *Arthrospira platensis* apresenta potencial para ser candidata como fonte de proteína na substituição de farinha de peixe (Nandeeshha *et al.* 2001). A quantidade de lipídios é de aproximadamente 6%, incluindo os lipídios tipo ômega 3 (DHA) e ômega 6 (ácido gama linoléico, GLA) e altas concentrações de pigmentos (β -caroteno) e vitaminas (Moorhead & Capelli 1993). Segundo Usharani (2013), esta

microalga está sendo utilizada como suplemento alimentar na dieta de peixes, camarões e aves.

História e características de Arthrospira platensis

A história conta que quando os espanhóis chegaram ao México, perceberam que os astecas haviam adquirido hábito alimentar baseado num tipo de pasta verde-azulada. Essa pasta era uma alga que crescia nas beiras dos lagos e era conhecida como *tecuiltatl* (Barnett 2005). Este alimento também tem sido até os dias atuais, o principal aporte proteico na dieta dos Kanembous, habitantes de uma região do Chade (Margulis & Sagan 2002).

A. platensis é uma microalga de água doce da classe Cyanophyceae, ordem Nostocales (Palmegiano *et al.* 2008), porém se adapta a água salgada. A produção de *A. platensis* atualmente apresenta três modalidades: crescimento de forma natural em lagos, sistema de produção em tanques tanto a céu aberto quanto em estufas e sistemas fechados de bio- reatores (Henrikson 2009). A produção total mundial no ano 2004 foi cerca de 45.000 toneladas, liderada pela China, os Estados Unidos do América, a Índia e a Tailândia (Habit *et al.* 2008).

Esta microalga apresenta características nutricionais interessantes, pois, possuem 65% de proteína, as paredes celulares dessa classe de cianobactéria são compostas por mucopolissacarídeos, dos quais 85% são digeríveis para os camarões (Nates & Tacon 2003). Usharani (2013) mencionam que a composição de aminoácidos das proteínas na cianobactéria é a de maior qualidade entre os vegetais, sendo superior a composição da soja. Outra característica importante é a composição dos ácidos graxos da *A. platensis*, dos quais podemos citar o ácido linoléico, ácido gama-linoléico, ácido palmítico, ácido docosaenoico, ácido araquidônico (James *et al.* 2006; Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez 2006; Pradhan *et al.* 2012). O conteúdo desses ácidos graxos na dieta são essências ao crescimento, na melhora do fator de conversão, sobrevivência e para a composição muscular em juvenis de camarão branco (Nates & Tacon 2003, Cuzon *et al.* 2004). A *A. platensis* além dos macronutrientes citados, apresentam alta quantidade de vitaminas do complexo B, elevadas concentrações de pigmentos e antioxidantes (Moorhead & Capelli 1993).

Palmegiano *et al.* (2005; 2008) reportaram que o gênero de peixe *Acipenser* alimentado com dietas que incluem *A. platensis* atingiram bons resultados no

crescimento. Jaime-Ceballos *et al.* (2006) e Jaime- Ceballos & Cerecero (2007) demonstraram que o farelo de *A. platensis* melhora a nutrição das larvas de *Litopenaeus schmitti* e provoca maior efeito na atratibilidade. Além de suas qualidades nutricionais, a cianobactéria mostra qualidades medicinais que aumentam a resposta do sistema imune dos ratos (Hayashi *et al.* 2005), atua de forma eficaz nos tratamentos de câncer para humanos (Chakdar *et al.* 2012), e também apresenta melhora no sistema imune de *L. vannamei* (Tayag *et al.* 2010; Lin *et al.* 2010).

Sistema imunológico de Litopenaeus vannamei

Os invertebrados marinhos estão em constante contato, em seu ambiente natural, com uma grande diversidade de microrganismos, incluindo múltiplos vírus, que podem constituir séria ameaça à sua sobrevivência. Contudo, o evidente sucesso desse grupo zoológico ao longo dos mais de 500 milhões de anos de história evolutiva confirma a presença de um sistema imunológico eficiente e capaz de protegê-los contra a invasão por agentes causadores de doenças (Barraco *et al.* 2008) .

A exemplo de outros invertebrados, os crustáceos apresentam apenas um sistema imune inato, diferentemente dos vertebrados que possuem, além desse, um sistema imune adaptativo (Barraco *et al.* 2008). O sistema imune inato se acha desde plantas até humanos e esta envolvidos no reconhecimento e controle dos estágios iniciais de infecção em todos os animais (Vazquez *et al.* 2009).

Os principais sistemas de defesa atualmente reconhecidos nos crustáceos são: (1) coagulação da hemolinfa; (2) melanização mediada pelo sistema pró-fenoloxidase (proPO); (3) reconhecimento e aglutinação celular mediada por lecitinas; (4) sistemas antibacterianos, antifúngicos e antivirais mediados por peptídeos, RNA de interferência e por proteínas de reconhecimento padrão; (5) produção de espécies redutoras de oxigênio e de nitrogênio; e (6) sistema fagocítico e de encapsulamento (Iwanaga & Lee, 2005).

Uma prática comum, dentro da medicina humana e veterinária, é a utilização de parâmetros hematológicos e bioquímicos para avaliar as condições de saúde dos indivíduos e para auxiliar no diagnóstico de diferentes enfermidades. Os parâmetros hemato-imunológicos mais comumente empregados em crustáceos são: (1) contagem total e diferencial de hemócitos, (2) coagulação da hemolinfa, (3) atividade da enzima pró-fenoloxidase (propo) (4) índice fagocítico, (5) produção de espécies redutoras de

oxigênio (ROIs), (6) atividade antimicrobiana, (7) ação hemaglutinante do plasma e (8) concentração de proteínas totais da hemolinfa (Barraco *et al.* 2008). O aumento na resposta imunológica é reconhecido pela determinação destes parâmetros nos crustáceos que foram tratados com imunoestimulante potenciais (Zhi *et al.* 2011).

Os hemócitos são componentes principais do sistema imune dos crustáceos e participam das atividades de fagocitose, encapsulação e lises de elementos estranhos (Johansson *et al.* 2000). Estes hemócitos são classificados em três grupos: hemócitos hialinos, responsáveis pela fagocitose, hemócitos granulares e hemócitos semi-granulares, com a capacidade de encapsular os organismos patógenos (Hose *et al.* 1990, Johansson *et al.* 2000, Jiravanichpaisal *et al.* 2006, Barracco *et al.* 2008, Lin *et al.* 2010). A fagocitose é o centro deste sistema imune com uma série de fatores humorais como aglutininas que favorecem e aperfeiçoam a fagocitose (Wang & Zhang 2008).

A apoptose não é considerado como mecanismo do sistema imune, mas sim um fenômeno fisiológico que atua frente às situações de infecção viral ajudando de maneira efetiva nas primeiras etapas eliminando os vírus. Desta forma, avaliar a quantidade de hemócitos que estão em apoptose (índice apoptótico) indica a capacidade de resistência à infecções virais (Roulston *et al.* 1999; Bitzer *et al.* 1999). Segundo Liu *et al.* (2010) a apoptose é um processo celular utilizado para evitar o desenvolvimento de patógenos e/ou remover células desnecessárias e potencialmente prejudiciais para os organismos.

A indução da apoptose inicia-se em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo as infecções virais, e envolvem várias alterações morfológicas celulares, como a condensação da cromatina, a fragmentação do núcleo, o *blebbing* da membrana, o encolhimento celular e finalmente a fragmentação da célula em pequenas vesículas revestidas por membrana, denominadas de corpos apoptóticos, que são em geral rapidamente fagocitados pelas células vizinhas (Lodish *et al.* 2000).

A eficiência da resposta imune primária em crustáceos é de suma importância para a sobrevivência e bom desempenho na criação destes animais aquáticos. A resposta imune em *L. vannamei* alimentados com dietas que incluem cianobactéria *A. platensis* não foi suficiente. Rahman *et al.* (2006) não obtiveram melhora no sistema imune de juvenis de *L. vannamei* frente ao síndrome da mancha branca quando alimentados com rações que incluíam *A. platensis*. Tayag *et al.* (2010) e Lin *et al.* (2010) testaram a resposta imune dos camarões frente diferentes agentes estressores (infecção do vibrio *Vibrio alginolyticus* e variação de pH, respectivamente) utilizando a técnica de exposição dos camarões em extrato de água quente utilizada para cultivo da

cianobactéria. Ambas as pesquisas obtiveram aumento na resposta imunológica demonstrada pela rápida recuperação nos níveis padrão de concentração de proteínas totais na hemolinfa e quantidade de hemócitos granulares e hialinos.

OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por cianobactéria *A. platensis* no desempenho zootécnico e os efeitos no sistema imunológico de camarão *L. vannamei*.

REFERÊNCIAS

BAUER W, C PRENTICE-HERNANDEZ, MB TESSER, W WASIELESKY & LHS POERSCH. 2012. Substitution of fishmeal with microbial flocculant meal and soy protein concentrate in diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 342-343:112-116.

BARNETT M. 2005. *Arthrospira platensis*: Brief History and Description. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6: 373-379.

BARRACCO MA, LM PERAZZOLO & RD ROSA. 2008. Inmunología del Camarón. pp 169-211. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 p.

BITZER M, F PRINZ, M BAUER, M SPIEGEL, WJ NEUBERT, M GREGOR, K SCHULZE-OSTHOFF & U LAUER. 1999. Sendai virus infection induces apoptosis through activation of caspase-8 (FLICE) and caspase-3 (CPP32). *Journal of virology*, 73: 702-708.

BOYD CE & GAUTIER D. 2000. Effluent composition and water quality standards. *Global Aquaculture Advocate* 3: 61-66.

BOYD CE. 2003. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. *Aquaculture*, 226: 101-112.

BRIGGS M, S FUNGE-SMITH, R SUBASINGHE & M PHILLIPS. 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. *RAP publication*, 10: 92.

CHAKDAR H, SD JADHAV, DW DHAR & S PABBI. 2012. Potential applications of blue green algae. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 71: 13-20.

CRUZ-SUÁREZ LE, D RICQUE-MARIE, M TAPIA-SALAZAR & C GUAJARDO-BARBOSA. 2000. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.

CUZON G, A LAWRENCE, G GAXIOLA, C ROSAS & J GUILLAUMED. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235: 513-551.

DIANA JS. 2009. Aquaculture production and biodiversity conservation. *Bioscience*, 59: 27-38.

- FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Roma. 231p.
- FORSTER IP, W DOMINY, L OBALDO & AGJ TACON. 2003. Rendered meat and bone meals as ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*, 219: 655-670.
- GATLIN DM, FT BARROWS, P BROWN, K DABROWSKI, TG GAYLORD, RW HARDY, E HERMAN, G HU, S KROGDAHL, R NELSON, K OVERTURE, M RUST, W SEALEY, D SKONBERG, EJ SOUZA, D STONE, R WILSON & E WURTELE. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aqua feeds: a review. *Aquaculture Research*, 38: 551-579.
- GOYTORTÚA-BORES E, R CIVERA-CERECEDO, S ROCHA-MEZA & A GREEN-YEE. 2006. Partial replacement of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal for fish meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Effects on growth and in vivo digestibility. *Aquaculture*, 256: 414-422.
- HABIB MAB, M PARVIN, TC HUNTINGTON & MRA HASAN. 2008. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. FAO Fisheries and Aquaculture Circular. No. 1034. Rome, FAO. 33p.
- HANEL R, D BROEKMAN, S DE GRAAF & D SCHNACK . 2007. Partial replacement of fishmeal by lyophylized powder of the microalgae *Spirulina platensis* in pacific white shrimp diets. *The Open Marine Biology Journal* 1: 1-5.
- HAYASHI O, S ONO, K ISHII, Y SHI, T HIRAHASHI & T KATOH. 2006. Enhancement of proliferation and differentiation in bone marrow hematopoietic cells by *Spirulina (Arthrospira) platensis* in mice. *Journal of applied phycology*, 18: 47-56.
- HENRIKSON R. 2009. Earth food *Spirulina*: How this remarkable Blue-green algae can transform your health and our planet, RoNo. re Enterprises Inc, Laguna Beach. USA. 180p.
- HILBORN R, JL ORENSANZ & AM PARMA. 2005. Institutions, incentives and the future of fisheries. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360: 47-57.
- HOSE JE, GG MARTIN & AS GERARD. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *The Biological Bulletin*, 178: 33-45.
- IWANAGA S & LEE BL. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 128-150.

JAIME-CEBALLOS BJ, A HERNÁNDEZ-LLAMAS, T GARCIA-GALANO & H VILLARREAL. 2006. Substitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus schmitti* larvae. *Aquaculture*, 260: 215-220.

JAIME-CEBALLOS B. & CERECEDO RC. 2007. Use of *Spirulina platensis* meal as feed attractant in diets for shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Hidrobiologica* 17: 113-117.

JAMES R, K SAMPATH, R THANGARATHINAM & J VASUDEVAN. 2006. Effect of dietary *Spirulina* level on growth, fertility coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus helleri*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 58: 97-104.

JIRAVANICHPAISAL P, BL LEE & K SÖDERHÄLL. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211: 213-236.

JOHANSSON MW, P KEYSER, K SRITUNYALUCKSANA & K SÖDERHÄLL, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191: 45-52.

JU ZY, DF DENG & W DOMINY. 2012. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Boone, 1931). *Aquaculture*, 354: 50-55.

KIRON V, W PHROMKUNTHONG, M HUNTLEY, JA ARCHIBALD & G DE SCHEEMAKER. 2012. Marine microalgae from refinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and white leg shrimp. *Aquaculture Nutrition*. 18: 521-531.

LIN YC, TAYAG CM, HUANG CL, TSUI WC & CHEN JC. 2010. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. *Fish & shellfish immunology*, 29: 1092-1098.

LIU H, K SÖDERHÄLL & P JIRAVANICHPAISAL. 2009. Antiviral immunity in crustaceans. *Fish & shellfish immunology*, 27: 79-88.

LODISH H, A BERK, SL ZIPURSKY, P MATSUDAIRA, D BALTIMORE & JE DARNELL. 2000. *Molecular Cell Biology*, WH Freeman and Company.

MARGULIS L & SAGAN D. 2002. *Acquiring Genomes: A Theory of the Origin of Species*. Basic Books, New York. 256p.

MARINHO-SORIANO E, MR CAMARA, T CABRAL & MA CARNEIRO. 2007. Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming. *Aquaculture research*, 38: 182-187.

MCINTOSH PR. 2000. Changing paradigms in shrimp farming. IV. Low protein feeds and feeding strategies. *Global Aquaculture Advocate* 3: 44-50.

MERINO G, M BARANGE, C MULLON & L RODWELL. 2010. Impacts of global environmental change and aquaculture expansion on marine ecosystems. *Global Environmental Change* 20: 586-596.

METIAN M & TACON AG. 2009. Fishing for feed or fishing for food: increasing global competition for small pelagic forage fish. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 38: 294-302.

MOORHEAD KJ & CAPELLI B. 1993. *Spirulina: nature's superfood*. Cyanotech Corporation. 71p.

NANDEESHA MC, B GANGADHARA, JK MANISSERY & LV VENKATARAMAN. 2001. Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. *Bioresource technology*, 80: 117-120.

NAYLOR R, RJ GOLDBURG, JH PRIMAVERA, N KAUTSKY, MC BEVERIDGE, J CLAY, C FOLKE, J LUBCHENCO, H MOONEY & M TROELL. 2000. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405: 1017-1024.

NAYLOR R & BURKE M. 2005. Aquaculture and ocean resources: Raising tigers of the sea. *Annual Review of Environment and Resources* 30: 185-218.

NAYLOR R, RW HARDY, PD BUREAU, A CHIU, M ELLIOTT, AP FARRELL, I FORSTER, MG DELBERT, RJ GOLDBURG, K HUA & PD NICHOLS. 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *PNAS*. 106: 36.

NATES SF & TACON AGJ. 2003. New Ingredients for Shrimp Feeds. Part II. ArA, Nucleotides, Algae, Seaweed. *Global Aquaculture Advocate*. October. 34-37.

OUIJIFARD A, J SEYFABADI, AA KENARI & M REZAEI. 2012. Fish Meal Replacement with rice protein concentrate in a practical diet for the Pacific white shrimp, (*Litopenaeus Vannamei* Boone, 1931). *Aquaculture International*, 20: 117-129.

PALMEGIANO GB, E AGRADI, G FORNERIS, F GAI, L GASCO, E RIGAMONTI, B SICURO & I ZOCCARATO. 2005. *Spirulina* as a nutrient source in diets for growing sturgeon (*Acipenser baeri*). *Aquaculture Research*, 36: 188-195.

PALMEGIANO GB, F GAI, F DAPRA, L GASCO, M PAZZAGLIA & PG PEIRETTI. 2008. Effects of *Spirulina* and plant oil on the growth and lipid traits of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) fingerlings. *Aquaculture Research*, 39: 587-595.

PAULY D, V CHRISTENSEN, S GUÉNETTE, TJ PITCHER, UR SUMAILA, CJ WALTERS & R WATSON. 2002. Towards sustainability in world fisheries. *Nature*, 418: 689-695.

PRADHAN J, BK DAS, S SAHU, NP MARHUAL, AK SWAIN, BK MISHRA & AE EKNATH. 2012 Traditional antibacterial activity of freshwater microalga *Spirulina platensis* to aquatic pathogens *Aquaculture Research*, 43: 1287-1295.

RAHMAN MM, CM ESCOBEDO-BONILLA, M WILLE, V ALDAY SANZ, L AUDOORN, J NEYTS, MB PENSART, P SORGELOOS & V NAUWYNCK. 2006. Clinical effect of cidofovir and a diet supplemented with *Spirulina platensis* in white spot syndrome virus (WSSV) infected specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 255: 600-605

RAMÍREZ-MORENO L & OLVERA-RAMIREZ R. 2006. Conocimientos acerca del alga *Spirulina (Arthrospira)*. *Interciencia*, vol.31 (n° 009), Venezuela.

ROULSTON A, RC MARCELLUS & PE BRANTON. 1999. Viruses and apoptosis. *Annual Review of Microbiology*, 53: 577-628

SILVA V, L OLIVEIRA L, LASP MADUREIRA, ABA OLIVEIRA, R CAPALONGA & AL SCARPARO. 2012 La anchoíta del extremo sur del Brasil: Una alternativa sustentable para la alimentación escolar. *Revista Española de Nutrición Comunitaria*. 18: 36-75.

SUÁREZ JA, G GAXIOLA, R MENDOZA, S CADAVID, G GARCIA, G ALANIS, A SUÁREZ, J FAILLACE & G CUZON. 2009. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*, 289: 118-123.

TAYAG CM, YC LIN, CC LI, CH LIOU & JC CHEN. 2010. Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28: 764-773.

TACON AG, MR HASAN & RP SUBASINGHE. 2006. Use of fishery resources as feed inputs for aquaculture development: trends and policy implications. *FAO fisheries circular*.

TACON AGJ, MR HASAN & M METIAN. 2011. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 564. FAO. 87 pp.

TERRAZAS-FIERRO M, R CIVERA-CERECEDO, L IBARRA-MARTÍNEZ, E GOYTORTÚA-BORES, M HERRERA-ANDRADE & A REYES-BECERRA. 2010. Apparent digestibility of dry matter, protein, and essential amino acid in marine feedstuffs for juvenile white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 308: 166-173.

THURSTAN RH, S BROCKINGTON & MR CALLUM. 2010. The effects of 118 years of industrial fishing on UK bottom trawl fisheries. *Nature Communications*, 1: 15.

USHARANI G. 2013. *Spirulina* Cultivation A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 3:6.

VAZQUEZ L, J ALPUCHE, G MALDONADO, C AGUNDIS, A PEREYRA-MORALES & E ZENTENO. 2009. Review: immunity mechanisms in crustaceans. *Innate immunity*, 15:179-188.

WANG W & ZHANG X. 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 522-527.

WASIELESKY WJR, H ATWOOD, A STOKES & CL. BROWDY. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 258: 396-403.

WELCH A, R HOENIG, J STIEGLITZ, D BENETTI, A TACON, N SIMS & B O'HANLON. 2010. From fishing to the sustainable farming of carnivorous marine finfish. *Reviews in Fisheries Science*, 18: 235-247.

ZHI B, W TANG & X ZHANG. 2011. Enhancement of shrimp antiviral immune response through caspase-dependent apoptosis by small molecules. *Marine biotechnology*, 13: 575-583.

**Substituição da farinha de peixes pela cianobactéria (*Arthrospira platensis*) na
formulação de dietas para *Litopenaeus vannamei***

RESUMO

O aumento no consumo de pescado *per capita* e a diminuição dos estoques pesqueiros estão tornando a aquicultura o principal fornecedor de pescado para consumo humano. A utilização de óleo e farinha de peixe como ingrediente principal para rações é o maior entrave para o desenvolvimento da aquicultura. Encontrar ingredientes alternativos para formulação de rações para a aquicultura permitirá um crescimento sustentável desta atividade. A cianobactéria *Arthrospira platensis* contém alto teor de proteínas e também efeito imunoestimulante em mamíferos, peixes e crustáceos. O objetivo da pesquisa foi avaliar o crescimento do camarão branco *Litopenaeus vannamei* e seus parâmetros hemato-imunológicos quando alimentados com dietas isoproteicas (~34%) experimentais que continham 0%, 25%, 50%, 75% e 100% de substituição de farinha de peixe (FP) por a cianobactéria *A. platensis* ao longo de 50 dias. No final do experimento, o peso final dos camarões alimentados com rações 100% de substituição foi menor, apresentando diferenças significativas ($P < 0,05$) com os demais camarões alimentados com menores taxas de substituição. Os parâmetros hemato-imunológicos apresentaram diferenças significativas nos percentuais de hemócitos hialinos e granulares a partir do nível de substituição 25%. No índice apoptótico também se obtiveram diferenças significativas, mas só no nível 100% de substituição. Os resultados de crescimento sugerem que a cianobactéria *A. platensis* pode substituir até 75% da FP. De acordo com os dados obtidos no presente estudo concluímos que a utilização de cianobactéria *A. platensis* na formulação de rações melhora o sistema imune do *L. vannamei*.

Palavras chave: *Arthrospira platensis*, parâmetros hemato-imunológicos, peso final, *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

The increase in fish consumption by humans and declining fish stocks will make of aquaculture fish's principal supplier for human consumption. The use of fish meal (FM) and fish oil as a main ingredient for animal feed is a major obstacle to the development of aquaculture. The discovery of alternative ingredients for aquaculture feedstuffs will allow sustainable growth of the activity. Cyanobacteria *Arthrospira platensis* contains a high quality protein concentration and also immune-stimulatory proprieties that were tested in mammals, fish and crustaceans. The purposes of this work were to evaluate the growth of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its haemato-immunological parameters fed experimental diets isonitrogenous (~ 34%), containing 0%, 25%, 50%, 75% and 100% replacement fish meal by the cyanobacteria *A. platensis* during 50 days. At the end of the experiment, shrimp's final weight showed lower development for animals fed with 100% replacement with significant differences ($P < 0.05$) with other substitution levels. The haemato-immunological parameters showed significant differences in the percentage of hyaline and granular haemocytes from 25% replacement level. The apoptotic index also showed highly significant differences, but only in treatment of 100% replacement. The growth results of *L. vannamei* fed with cyanobacteria *A. platensis* suggest that could be replaced up to 75% of the FM. According to the data obtained in this study concluded that the use of cyanobacteria *A. platensis* in feed formulation improves the immune system of *L. vannamei*.

Keywords: *Arthrospira platensis*, final weight, immunology, *Litopenaeus vannamei*.

INTRODUÇÃO

No ano 2011 o uso de pescado como alimento humano atingiu 85%, restando somente 15% para redução a farinha de peixe (FP) e óleo de peixe (OP) para consumo não humano (FAO 2012). Durante o ano 2008 a carcinocultura utilizou 27,2% FP e 12,9% OP do produzido mundialmente para a formulação de rações (FAO 2012). As rações comerciais para camarão incluem normalmente entre 25% e 50% de FP (Amaya *et al.* 2007). O futuro desenvolvimento da aquicultura vai estar ligado na utilização de ingredientes alternativos a FP.

Os preços da farinha peixe tem aumentado em decorrência do incremento na demanda (principalmente Ásia e América do Sul) e devido à eventos naturais cíclicos, como por exemplo o *El Niño* (Merino *et al.* 2010). Esses fatores afetam diretamente os estoques naturais de peixes utilizados na produção de farinha e óleo (Merino *et al.* 2010; FAO 2012).

Segundo Wasielesky *et al.* (2006), os custos com alimentação na aquicultura podem atingir cerca de 60% dos totais de produção. Neste sentido, a redução dos gastos de produção é necessária, o que vem sendo possível, em parte, graças à formulação de novas rações com reduzida dependência das proteínas derivadas dos subprodutos de pescado (Patnaik *et al.* 2006). Pascual *et al.* (2004) indicaram que a necessidade de proteínas para *L. vannamei* na dieta deve ser mais de 35% pois são fontes importantes de energia para o crescimento e sistema imune do camarão branco. Inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas visando a substituição da FP nas rações para camarões por fontes proteicas alternativas, como vegetais, subprodutos de origem marinha e avícola (Belay *et al.* 1996; Goytortúa-Bores *et al.* 2006; Jaime-Ceballos *et al.* 2006; Ju *et al.* 2009; Cruz-Suárez *et al.* 2007; Bauer *et al.* 2012; Oujifard *et al.* 2012; Ju *et al.* 2012; Kiron *et al.* 2012).

O uso de microalgas na alimentação animal aumentou nos últimos anos (Hu 2004). Uma espécie de microalga (cianobactéria) que vem recebendo atenção é *Arthrospira platensis* (Stinzenberger, 1852), a qual é de água doce da classe *Cyanophyceae* pertencente à ordem Nostocales (Palmegiano *et al.* 2008). Os principais produtores desta cianobactéria são a China e os Estados Unidos de América (Habbib *et al.* 2008). Mais de 50% da produção de *A. platensis* vem sendo utilizada como suplemento alimentar na nutrição animal (Spolaore *et al.* 2006), devido a sua composição rica em aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais, carboidratos e ácidos

graxos: ácido gama linoléico (GLA), ácido palmítico, ácido oleico e ácido araquínôdico (ARA) (James *et al.* 2006; Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez, 2006; Pradhan *et al.* 2012). Esta cianobactéria também pode ser importante na formulação de dietas para aquicultura porque esta formada por componentes bioativos com atividade antioxidante (Abdel-Tawwab1 & Ahmad, 2009).

Belay *et al.* (1996) indicaram que a *A. platensis* poderia substituir mais do 50% das proteínas na formulação de dietas para aquicultura. Cuzon *et al.* (1981) realizaram os primeiros estudos incluindo a cianobactéria *A. platensis* na formulação de rações para engorda de camarões. Na ocasião, testou-se uma dieta sem e outra com 8% de cianobactéria para *Marsupenaeus japonicus*, sendo a dieta que incluía a *A. platensis* a qual apresentou melhor desempenho para esses crustáceos. Posteriormente, outros trabalhos foram realizados com substituição parcial de FP por farelo de *A. platensis* (FAP) em rações para diversos organismos, como para *Catla catla*, *Labeo rohita*, *Litopenaeus schmitti*, *Acipenser baeri*, *Poecilia reticulata* e *Oncorhynchus mykiss* (Nandeeshya *et al.* 2001; Jaime-Ceballos *et al.* 2007; Palmegiano *et al.* 2008; Dernekbasi *et al.* 2010; Temouri *et al.* 2013).

As qualidades da cianobactéria como imunestimulante é conhecida para mamíferos (Hirahashi *et al.* 2002; Henrikson, 2009), porém avaliar o efeito da mesma no sistema imunológico do camarão torna se alvo da atual pesquisa. O estudo do sistema imunológico de *L. vannamei* é de suma importância, já que os crustáceos tem grande susceptibilidade de ser infectados pelos patógenos que habitam o meio aquático. O sistema imunológico dos crustáceos consta unicamente de sistema imune inato, o qual é responsável pelo reconhecimento e fagocitose dos patógenos (Barraco *et al.* 2008). Os hemócitos nos crustáceos são o principal mecanismo na resposta imunológica já que participam nas funções de fagocitose, encapsulamento, formação de nódulos e mediam na cito toxicologia da célula (Hose *et al.* 1990, Johansson *et al.* 2000, Jiravanichpaisal *et al.* 2006, Sarathi *et al.* 2007, Barracco *et al.* 2008, Lin *et al.* 2010). Foi utilizado o porcentual de hemócitos, a concentração de proteínas na hemolinfa e a taxa apoptótica para avaliar o sistema imunológico do camarão *L. vannamei*.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por cianobactéria *A. platensis* no desempenho zootécnico e os efeitos no sistema imunológico de camarão *L. vannamei*.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de camarões e formulação das dietas

As larvas de camarões foram adquiridas da empresa Aquatec (Brasil) e recebidas no laboratório da Estação Marinha de Aquicultura (FURG). Essas larvas foram mantidas em tanque de 10.000 litros com salinidade 34, temperatura 27°C e alimentadas com ração comercial durante aproximadamente um mês. Logo 300 juvenis de camarão *L. vannamei* com peso inicial médio de $0,7 \pm 0,1$ g foram selecionados para a realização do experimento durante 50 dias em um sistema estático de água, composto por 15 tanques plásticos com um volume útil de 310 litros e uma área de $0,35\text{m}^2$. Foram distribuídos aleatoriamente 20 camarões por tanque, resultando em uma densidade de 59 camarões/ m^2 . Foi utilizada água marinha com salinidade 34, previamente filtrada em filtros de 25, 5 e 1 μm , clorada com hipoclorito de sódio a 15 ppm e declorada com ácido ascórbico (1 ppm). Posteriormente, a mesma foi tratada com EDTA (20 ppm), para evitar contaminação com metais pesados. Esta água foi mantida aquecida à 27 °C em reservatório de água de 10.000 L para posterior utilização nas renovações diárias de água do sistema.

A salinidade, temperatura, pH, e oxigênio dissolvido foram mensurados duas vezes diariamente por meio sonda multiparâmetros YSI® modelo 556. Amônia, nitrito e nitrato foram medidas concordando com a metodologias descritas pela Unesco (1983), Bendschneider & Robinson (1952) e Aminot & Chaussepied (1983), respectivamente. Alcalinidade foi mantida acima de 100 mg L^{-1} de CaCO_3 sendo necessária uma única aplicação de $0,05\text{ g L}^{-1}$ de cal hidratada, conseguindo dessa forma manter os níveis de pH e alcalinidade apropriados para o bom desempenho do *L. vannamei* de acordo com Furtado *et al.* (2011). Estes últimos parâmetros foram medidos duas vezes por semana durante os 50 dias de experimento e mantidos nos padrões para o bom desempenho de *L. vannamei*. O fotoperíodo utilizado foi de 12 horas claro-12 horas escuro. Diariamente, os tanques eram sifonados para retirada de fezes e mudas, cerca de 30% do volume de água de cada tanque renovado.

Foram formuladas 5 dietas com diferentes níveis de substituição de FP por FAP (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). As rações mantiveram-se isoprotéicas e isoenergéticas com aproximadamente 34% de proteína, 8% de extrato etéreo e 3.800 Kcal/Kg de

energia bruta (Tabela 1). A composição centesimal dos ingredientes e das rações formuladas foi analisada de acordo com a metodologia proposta por A.O.A.C. (2000).

Tabela 1. Composição (g/100g) dos ingredientes avaliados nas dietas experimentais para *L. vannamei*, níveis de substituição e composição proximal na matéria seca das rações.

Ingredientes	Proteína Bruta	Extrato Etéreo	Cinzas	ENN¹	Umidade	Fibra Bruta
Farinha de <i>A. platensis</i>²	66,93	1,75	8,70	20,85	-	1,77
Farinha de Peixe³	68,63	11,48	13,63	4,86	7,95	-
Níveis de substituição						
Ingredientes	0%	25%	50%	75%	100%	
Farinha de peixe³	40%	30%	20%	10%	0%	
<i>Arthrospira platensis</i>²	0%	10%	20%	30%	40%	
Farelo de soja	5%	5%	5%	5%	5%	
Levedura de cerveja	5%	5%	5%	5%	5%	
Amido de milho	20%	20%	20%	20%	20%	
Farelo de trigo	15%	15%	15%	15%	15%	
Óleo de peixe⁴	2,2%	3,2%	4,2%	5,2%	6,2%	
CMC⁵	2%	2%	2%	2%	2%	
Mistura mineral e vitamínica⁶	1%	1%	1%	1%	1%	
Colesterol⁷	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	
Ca(H₂PO₄)⁷	2%	2%	2%	2%	2%	
Celulose⁷	7,3%	6,3%	5,3%	4,3%	3,3%	
Composição proximal na matéria seca das rações						
Proteína	36,6%	35,8%	33,9%	33,4%	33,8%	
ENN¹	36,9%	37,9%	38,7%	40,3%	40,8%	
Extrato etéreo	8,3%	8,3%	6,4%	6,8%	8,3%	
Matéria seca	9,5%	5,4%	6,5%	7,6%	10,1%	
Cinzas	8,9%	8,9%	8,4%	8,2%	7,1%	
Fibras	9,3%	8,6%	8,6%	7,4%	9,3%	

Carboidrato⁸	46,2	46,4	45,2	47,7	50,1
Energia bruta (cal/g)	3705,5	3745,9	3786,4	3826,9	3867,4

¹ ENN=100- (proteína bruta+ extrato etéreo + cinzas+ umidade).

² Fornecida pela Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, C.P. 474, Rio Grande (RS), 96 201-900, Brasil.

³ Leal Santos, Rio Grande, RS, Brasil.

⁴ Indústria e comércio de óleos vegetais Campestre, São Paulo, Brasil

⁵ CMC (Carboximetil celulose) Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil.

⁶ Vitamina A (500.000 UI/kg), Vit. D3 (250.000 UI/kg), Vit. E (5.000 mg/kg), Vit. K3 (500 mg/kg), Vit. B1 (1.000 mg/kg), Vit. B2 (1.000 mg/kg), Vit. B6 (1.000 mg/kg), Vit. B12 (2.000 mcg/kg), Niacina (2.500 mg/kg), Pantotenato de Cálcio (4.000 mg/kg), Ácido Fólico (500 mg/kg), Biotina (10mg/kg), Vit. C (10.000 mg/kg), Colina (100.000 mg/kg), Inositol (1.000 mg/kg), Selênio (30 mg/kg), Ferro (5.000 mg/kg), Cobre (1.000 mg/kg), Manganês (5.000 mg/kg), Zinco (9.000 mg/kg), Cobalto (50 mg/kg), Iodo (200 mg/kg).

⁷ VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil.

⁸ Carboidrato = ENN+ Fibras

Os ingredientes foram moídos com auxílio de um moedor elétrico com malha de 100 µm. Para o preparo das dietas primeiramente foram misturados os ingredientes sólidos e em seguida os ingredientes líquidos (óleo de peixe e água à 50°C) em batedeira. Após obter uma pasta firme, essa foi peletizada utilizando moedor de carne. Em seguida foram levadas à estufa com temperatura de 60°C durante 24 horas. O tamanho dos pellets foi ajustado conforme o nível de desenvolvimento dos camarões, de acordo com Jory *et al.* (2001). As rações foram armazenadas em sacos plásticos e conservadas em freezer à -18°C até o momento da utilização.

Alimentação e cálculo dos parâmetros de crescimento

A alimentação dos camarões foi realizada três vezes ao dia nos horários de 8:00, 14:00 e 19:00 horas. A cada 15 dias ao longo do experimento foram realizadas biometrias para determinar a biomassa/tanque e assim poder ajustar a quantidade de alimento ofertado de acordo com o relatado por Jory *et al.* (2001). As taxas de crescimento e sobrevivência dos animais também eram avaliadas após as biometrias.

Indicadores de Desenvolvimento dos Camarões

Para avaliar o desenvolvimento dos animais ao final do período experimental foram avaliados os seguintes parâmetros: Ganho em peso semanal = (peso final/ tempo experimento [semanas]); Taxa de conversão alimentar = alimento seco total fornecido (g) / ganho em peso úmido(g); Taxa de crescimento específico = $(100 \times [\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}] / \text{tempo do experimento [dias]})$; PER: taxa de eficiência proteica = ganho em peso (g) / proteína fornecida (g); Sobrevivência % = $(100 \times [\text{número final de camarões} / \text{número inicial de camarões}])$.

A análise de composição proximal do músculo foi realizada na Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande utilizando um total de 45 camarões (5 por unidade experimental). A concentração de proteínas, extrato etéreo, cinzas e umidade da composição de músculo do camarão branco esta descrita no protocolo da A.O.A.C. (2000).

*Estudo do sistema imunológico *L. vannamei**

Ao final do experimento, 5 camarões de cada unidade experimental foram coletados. A hemolinfa (aproximadamente 45 μL totais por cada tratamento) foi retirada por punção cardíaca, 15 μL por tratamento foram corados com a técnica de May-Grunwald-Giemsa para a quantificação de hemócitos. A quantificação de hemócitos foi realizada em ocular de integração de 5 linhas e 25 pontos (Carl Zeiss) segundo Weibel (1980). Outros 15 μL de hemolinfa foram utilizados para a determinação da concentração de proteínas totais na hemolinfa pelo método descrito por Bradford (1976).

Outra alíquota de 0,5 μL por camarão foi utilizada na preparação de 5 extensões em lamina, por tratamento. Para avaliar a quantidade de hemócitos em apoptose nas extensões foi utilizado o kit ApopTag® Peroxidase In situ (Millipore) "TUNEL REACTION", de acordo com Charriaut-Marlangue & Ben-Ari (1995) e Wang & Zhang (2008).

Análises estatísticas

O delineamento experimental foi aleatório e estava composto por cinco tratamentos com três réplicas cada. Análise de variância uma via (ANOVA) foi utilizada para verificar o efeito das dietas sobre o desenvolvimento e imunologia dos camarões, após serem atendidas as premissas de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e homocedasticidade pelo teste de Levene. Posteriormente foi aplicado o teste de Newman-Keuls para avaliar se houve diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

RESULTADOS

Parâmetros físico-químicos da água

A salinidade foi de 34, a temperatura média foi de $27 \pm 0,1^\circ\text{C}$, a concentração de oxigênio dissolvido de $5,9 \pm 0,25$ mg/L e o pH médio de $8,18 \pm 1,9$. A amônia total na água se manteve em torno de $0,44 \pm 0,25$ mg /L e foi mensurada semanalmente juntamente com o nitrito ($0,015 \pm 0,01$ mg /L) e o nitrato ($0,025 \pm 0,03$ mg/L).

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água obtidos ao longo do experimento, representados valores médios \pm desvio padrão ($n=15$) de todos os tratamentos.

S	T°(°C)	O.D(mg/L)	pH	[NH ₄ ⁺](mg/L)	[NO ₂ ⁻](mg/L)	[NO ₃ ⁻](mg/L)
34	$27 \pm 0,1$	$5,9 \pm 0,25$	$8,18 \pm 1,9$	$0,44 \pm 0,25$	$0,015 \pm 0,01$	$0,025 \pm 0,03$

Índices de crescimento e composição proximal muscular

Os resultados dos parâmetros zootécnicos obtidos ao final do experimento estão apresentados na Tabela 3. Diferenças significativas ($p < 0,05$) ocorreram apenas no último nível de substituição para todas as variáveis, exceto na sobrevivência que foi superior a 90% em todos os tratamentos e não apresentou diferenças estatísticas. Observou-se que a inferior taxa de eficiência proteica foi obtida para os camarões alimentados com as dietas com maior nível de substituição de cianobactéria.

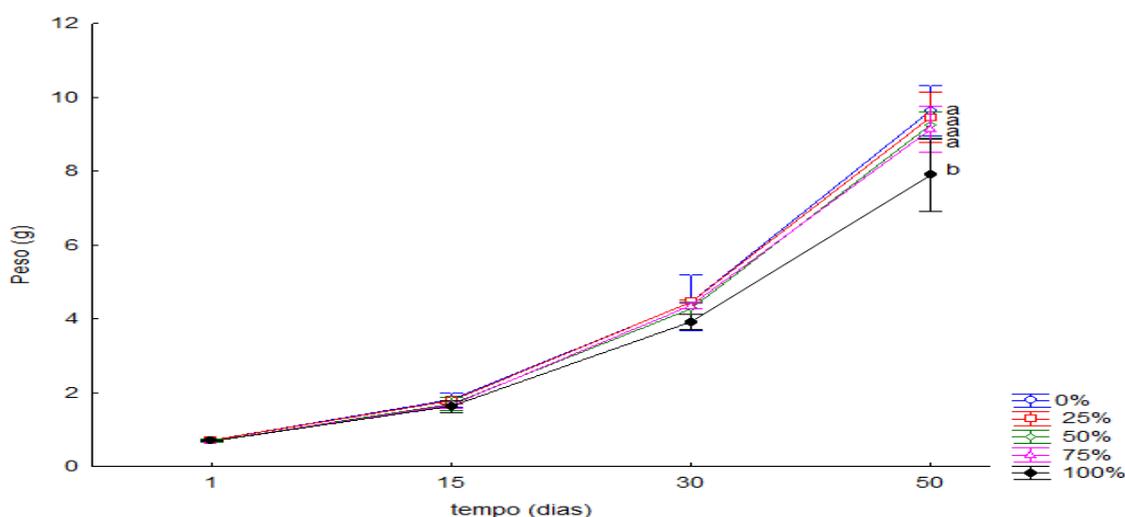
Tabela 3. Valores médios \pm desvio padrão (n=3) do peso e indicadores de desenvolvimento de *L. vannamei* ao final de 50 dias de experimento.

Dieta	Ganho de Peso (g)	Ganho de Peso (g) / semana	Taxa de Conversão Alimentar	Taxa de Crescimento Específico	Taxa de Eficiência Proteica	Sobrevivência (%)
0	8,92 \pm 0,97 ^a	1,28 \pm 0,09 ^a	1,61 \pm 0,04 ^b	5,02 \pm 0,16 ^a	1,71 \pm 0,19 ^{ab}	90,00 \pm 1,73
25	8,75 \pm 1,10 ^a	1,25 \pm 0,03 ^a	1,62 \pm 0,06 ^b	5,09 \pm 0,11 ^a	1,72 \pm 0,21 ^{ab}	95,00 \pm 1,00
50	8,54 \pm 0,97 ^a	1,22 \pm 0,04 ^a	1,61 \pm 0,02 ^b	5,06 \pm 0,13 ^a	1,76 \pm 0,20 ^a	93,30 \pm 0,58
75	8,45 \pm 0,77 ^a	1,21 \pm 0,01 ^a	1,66 \pm 0,05 ^b	5,08 \pm 0,19 ^a	1,77 \pm 0,16 ^a	95,00 \pm 1,00
100	7,20 \pm 0,85 ^b	1,03 \pm 0,05 ^b	1,79 \pm 0,05 ^a	4,75 \pm 0,13 ^b	1,67 \pm 0,18 ^b	95,00 \pm 1,00

Letras diferentes na vertical indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Newman Keuls ao nível de 5%

A Figura 1 mostra o crescimento dos camarões ao longo do tempo (50 dias), onde podemos observar um menor ganho de peso para os camarões alimentados com 100% de substituição de FP por cianobactéria, apresentando diferenças significativas com os demais tratamentos.

Figura 1. Representação do peso de *L. vannamei* nas biometrias realizadas durante a realização do experimento expressado em peso médio mais o desvio padrão dos diferentes tratamentos.



Letras diferentes na vertical indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Newman Keuls ao nível de 5%

Os camarões alimentados com as dietas com substituição de 25 e 100% de FP apresentaram menores concentrações de proteína no músculo com diferenças estatísticas. Os camarões alimentados com 100% de substituição também apresentaram menor conteúdo de água (Tabela 4).

Tabela 4. Composição Proximal do músculo do camarão na matéria úmida.

Dieta	Proteína (%)	Cinzas (%)	Extrato etéreo (%)	Umidade (%)
0	22,23±1,66 ^{ab}	1,83±0,12	3,29±0,63	75,15±0,46 ^{ab}
25	20,56±2,14 ^b	2,02±0,43	3,12±0,23	74,75±0,19 ^b
50	22,58±0,17 ^{ab}	1,83±0,03	3,16±2,23	75,50±0,26 ^a
75	24,51±0,72 ^a	1,76±0,05	3,41±0,85	74,52±0,08 ^{bc}
100	20,51±0,99 ^b	1,95±0,08	3,63±0,07	74,01±0,15 ^c

Letras diferentes na vertical indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Newman Keuls ao nível de 5%

Resultados da avaliação de parâmetros imunológicos

Os resultados dos parâmetros imunológicos avaliados podem ser observados na Tabela 5. A concentração de proteínas na hemolinfa foi estatisticamente superior para os camarões alimentados com 50, 75 e 100% de substituição da farinha de peixe, em relação aos demais tratamentos. Para os dados de hemócitos granuloso e hialino, observaram-se diferenças estatísticas significativas quando a substituição de FP por FAP foi de 25%, indicando uma maior quantidade de hemócitos granuloso na hemolinfa dos camarões alimentados com *A. platensis* e menor percentual de hemócitos hialinos. O índice apoptótico só apresentou diferenças significativas nos camarões que foram alimentados com as dietas com maior nível de substituição.

Tabela 5. Concentração de proteínas totais (PrH), porcentual de hemócitos granulados (HG) e hialinos (Hh), apoptose celular na hemolinfa de camarões alimentados com diferentes níveis de substituição da farinha de peixe por *Arthrospira platensis*.

Dieta	PrH (mg/ml)	HG (%)	Hh (%)	Apoptose
0	120,13±0,64 ^b	65,40±0,72 ^b	34,60±0,72 ^a	4,00±1,20 ^a
25	119,66±1,15 ^b	71,27±2,20 ^a	28,73±2,20 ^b	3,93±1,10 ^a
50	125,13±2,00 ^a	72,80±2,46 ^a	27,20±2,46 ^b	2,60±0,35 ^{ab}
75	124,73±1,47 ^a	74,67±1,10 ^a	25,33±1,10 ^b	2,47±0,70 ^{ab}
100	124,73±2,60 ^a	72,40±2,46 ^a	27,60±2,46 ^b	1,73±0,41 ^b

Letras diferentes na vertical indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Newman Keuls ao nível de 5%

DISCUSSÃO

Os resultados de desenvolvimento de *Litopenaeus vannamei* indicam que é possível realizar a substituição de 75% da FP pela cianobactéria *A. platensis* sem ocasionar comprometimento zootécnico. Os números finais dos parâmetros hematoimunológicos conferem que a partir de 25% de substituição de FP por cianobactéria os camarões estarão bem preparados imunologicamente frente futuras infecções.

Diferentes farelos de algas e microalgas estão sendo testados como alimentos para camarões (Marinho-Soriano *et al.* 2007, Ju *et al.* 2009, Henrikson, 2009) e peixes tanto de água doce quanto salgada (Nadeensha *et al.* 2001, Palmegiano *et al.* 2005, Kiron *et al.* 2012). As microalgas têm sido utilizadas na dieta de camarões como atrativos (Jaime-Ceballos *et al.* 2005, Jaime-Ceballos *et al.* 2007; Silva-Neto *et al.* 2012), complemento alimentar (Belay *et al.* 1996; Cruz-Suarez *et al.* 2000) ou substituintes parciais (Cuzon *et al.* 1981; Jaime Ceballos *et al.* 2005; Marinho-Soriano *et al.* 2007; Ju *et al.* 2009; Ju *et al.* 2012; Kiron *et al.* 2012).

Cuzon *et al.* (1981) substituindo 8% da levedura láctica por cianobactéria não obteve diferenças no desempenho do *Marsupenaeus japonicus*. Hanel *et al.* (2007) obtiveram bons resultados de crescimento para *L. vannamei* quando alimentados com ração de 44,7% de proteína (mistura de ração de carpa com baixo conteúdo de proteína mais liofilizado de *A. platensis*). Nos casos relatados anteriormente, observamos que a

substituição das proteínas contidas na dieta pelas proteínas de cianobactéria não foi alta. Outras pesquisas realizadas com diferentes micro e macro algas conseguiram substituir níveis mais elevados de FP (Kiron *et al.* 2012; Ju *et al.* 2012). Na pesquisa realizada por Kiron *et al.*(2012) atingiu-se níveis de 40% de substituição de FP por proteínas das microalgas *Nanofrustulum* e *Tetraselmis* para a espécie *L. vannamei* sem afetar o crescimento. Ju *et al.* (2012) concluíram que a substituição de 50% de FP por farelo de microalga *Haematococcus pluvialis* não afeta o desenvolvimento do camarão *L. vannamei*, sendo esse resultado atingido o mais próximo do obtido na presente pesquisa.

A composição química da cianobactéria *A. platensis* varia dependendo do tipo de cultivo (Hu 2004). Belay *et al.* (1996) mencionaram que a utilização de *A. platensis* ou seus extratos oferece benefícios na criação de peixes e gado devido a seus efeitos nutricionais e melhor capacidade de assimilação das proteínas. A alta concentração de proteínas de qualidade da cianobactéria é o principal motivo de sua utilização em dietas (Guröy *et al.* 2010), já que apresenta uma concentração proteica de até o 65% e está entre os organismos com maior conteúdo de proteínas da natureza (Henrikson, 2009).

A digestibilidade da proteína que forma parte da cianobactéria é alta devido que carece de celulose na parede celular (Henrikson, 2009; Temouri *et al.* 2013). Fato que pode levar ao sucesso na elevada substituição pela proteína de FP quando comparada com a substituição obtida para outras micro e macro algas (*Macrocystis pyrifera* (12%) (Cruz-Suarez *et al.* 2000), *Nanofrustulum* e *Tetraselmis* (16,5% e 44,5% respectivamente) (Kiron *et al.*2012) e *Haematococcus pluvialis* (40,3%) (Ju *et al.* 2012). Usharani (2013) afirmaram que os aminoácidos que compõem as proteínas da cianobactéria são os de maior qualidade entre os vegetais.

A utilização de rações que incluem alta concentração de *A. platensis* para a criação de animais pode acarretar menores taxas de crescimento (Spolaroe *et al.* 2008). No caso dos camarões é conhecido que estão mais bem adaptados na utilização das proteínas como fonte de energia (Rosas *et al.* 2002, Marinho- Soriano *et al.* 2007), porém o maior conteúdo de carboidratos nas rações de pode ser o motivo dessas baixas taxas de crescimento para os camarões alimentados com rações de 100% de cianobactéria.

O estudo da imunologia dos camarões nos últimos anos vem tomando importância na aquicultura, devido que surtos de doenças provocam a perda total da produção. Estresse e mudanças ambientais provocam diminuição na quantidade de hemócitos, da atividade da fenoloxidase e outras atividades enzimáticas conectadas com

a imunologia, fato que aumenta a suscetibilidade em crustáceos e moluscos aos patógenos (Pan *et al.* 2008). O sistema imunológico de diferentes espécies melhora quando utilizamos a cianobactéria como suplemento alimentar (Henrikson, 2009), porque a cianobactéria inclui componentes como a ficocianina, vitamina A, ferro, componentes fenólicos e ácidos graxos, os quais exercem ações fisiológicas importantes no corpo dos animais (Moreira *et al.* 2011). Pesquisas anteriores indicam que o sistema imunológico do camarão *L. vannamei* melhora quando são expostos ao extrato de água quente de cultivo de cianobactéria (Lin *et al.* 2010; Tayag *et al.* 2010; Lin *et al.* 2012).

O componente principal do sistema imunológico dos camarões são os hemócitos (Hose *et al.* 1990, Johansson *et al.* 2000, Jiravanichpaisal *et al.* 2006, Barracco *et al.* 2008, Lin *et al.* 2010). Segundo Sarathi *et al.* (2007) concentrações menores no número de hemócitos na hemolinfa está relacionado com organismos que apresentam menor resistência aos patógenos. No presente estudo, os camarões apresentaram aumento de 10% na quantidade de hemócitos granulados quando alimentados com dietas que continham *A. platensis*, da mesma maneira foi observado por Tayag *et al.* (2010). O aumento de hemócitos se transcreve como efeito imunoestimulante positivo já que potencializa as defesas naturais do camarão. Sirirustananun *et al.* (2011) incluíram extrato de *Gracilaria tenuistipitata* na alimentação de camarão branco e obtiveram aumento no sistema imune incrementando a fagocitose e no sistema da profeniloxidase devido ao aumento nos hemócitos circulantes na hemolinfa.

As peneidinas são a família de peptídeos antimicrobianos do crustáceo camarão branco (Destoemieux *et al.* 1997). Destoemieux *et al.* (2000) também indicaram que os hemócitos granulados são o principal local de síntese e armazenamento do peptídeo peneidina. O peptídeo peneidina é a primeira molécula antimicrobiana achada em crustáceos peneídos (Rodriguez & Le Moullac 2000), pois apresenta papel importante na proteção dos mesmos frente às infecções microbianas que estão particularmente expostos durante o processo de muda (Destoemieux *et al.* 2000). Moreira *et al.* (2011) destaca que grande números de peptídeos derivados de proteínas inclusas na alimentação indicam a presença de propriedades funcionais como a imunoestimulação.

Avaliar a concentração de proteínas inclusas na hemolinfa de crustáceos vai fornecer informação sobre a saúde do animal (Lorenzon *et al.* 2011). A concentração de proteínas totais na hemolinfa para juvenis saudáveis de *L. vannamei* é 120 mg/ml, este nível de proteínas na hemolinfa tem relação com o nível de proteínas na dieta (Rodriguez & Le Moullac 2000), durante esta pesquisa a concentração de proteínas

totais na hemolinfa foi maior para os camarões que foram alimentados com dietas que incluíam mais de 50% da cianobactéria na formulação, mas estas eram isoprotéicas, podendo demonstrar provavelmente que a proteína da cianobactéria é maiormente aproveitada na digestão e convertida em componentes do sistema imunológico. Este aumento na concentração de proteínas totais indica melhor desempenho do sistema imune já que entre estas proteínas se encontra fundamentalmente hemocianinas, aglutininas e vários peptídeos antimicrobianos como as penaidínas e defensinas (Suzuki et al. 1990; Kawabata & Iwanaga, 1999).

Segundo Liu *et al.* (2009) a apoptose permite que as células fiquem prontas para iniciar o processo de morte celular programada frente ameaça de infecção viral. Se a apoptose acontece ao começo da infecção viral provocará que a doença ocorra devagar, limitando assim o espalhamento da virose pelo hospedeiro (Leu *et al.* 2012). Diminuir a apoptose celular dificulta que as viroses se espalhem pelas células vizinhas (Rijiravanich *et al.* 2008). O camarão *Monopeneaus monodon* começa a apoptose após infecção da virose da mancha branca, espalhando a virose e contribuindo na mortalidade do crustáceo (Wongprasert *et al.* 2003). Segundo Leu *et al.* (2012) a expressão das proteínas da pro-apoptose vai ser disparada quando os sensores da célula detectam a entrada de vírus. Os resultados obtidos durante a presente pesquisa mostram uma redução no índice apoptótico nos tratamentos onde foi inclusa a *A. platensis* favorecendo a imunologia do *L. vannamei*.

Akira *et al.* (2011) reportaram que a utilização de algumas algas podem ser usadas como alternativas medicinais para regular as respostas imunológicas porque incluem polissacarídeos que permitem a rápida recuperação das inflamações alérgicas. Provavelmente, os bons resultados observados para os parâmetros hematoimunológicos decorrem da composição das microalgas, as quais são ricas em compostos bioativos como hormônios de crescimento, micronutrientes (vitaminas e minerais), aminoácidos e ácidos graxos (Ju *et al.* 2012).

CONCLUSÃO

A. platensis é um ingrediente eficaz para a substituição parcial de FP na formulação de novas rações para *L. vannamei*, já que até o nível de 75% de substituição o crescimento específico do camarão branco não foi afetado. A formulação dessas novas dietas com inclusão da cianobactéria reduz a dependência da farinha de peixe, além de poder abrir novas alternativas na utilização dos subprodutos da farinha de peixe.

A resposta imune foi melhorada com a substituição de FP por FAP, mostrando incremento nos valores de proteínas na hemolinfa, hemócitos granulados e redução na taxa de apoptose celular. Assim, é possível concluir que a inclusão de farinha de *Arthrospira platensis* melhora a resposta imune do *L. vannamei*.

REFERÊNCIAS

ABDEL-TAWWAB M & AHMAD MH. 2009. Live Spirulina (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 40: 1037-1046.

AKIRA T, F TERUYUKI, O HIROMI, T TAKAHIRO, K YUTAKA & O SHIRO. 2011. Effects of Edible Algae on immune responses: algae polysaccharides regulate delayed-type hypersensitivity and tumor growth. *Kuroshio Science* 5: 59-65.

AMAYA E, DA DAVIS & DB ROUSE. 2007. Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 262: 419-425.

AMINOT A & CHAUSSEPIED M. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Brest, CNEXO, 379p.

A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. EUA.

BAUER W, C PRENTICE-HERNANDEZ, MB TESSER, W WASIELESKY JR & LHS POERSCH. 2012. Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 342-343: 112-116.

BARRACCO MA, LM PERAZZOLO & RD ROSA. 2008. Inmunología del Camarón pp 169-211. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica -

Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 pp.

BELAY A, T KATO & Y OTA. 1996. Spirulina (*Arthrospira*): potential application as an animal feed suplement. Journal of Applied Phycology 8: 303-311.

BENDSCHNEIDER K & ROBINSON RJ. 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. JOURNAL Mar. Research., 11: 87-96.

BRADFORD MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72: 248-254.

CHARRIAUT-MARLANGUE C & BEN-ARI Y. 1995. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. Neuroreport 7: 61-64.

CRUZ-SUÁREZ LE, M NIETO-LÓPEZ, C GUAJARDO-BARBOSA, M TAPIA-SALAZA, U SCHOLZ & D RICQUE-MARIE. 2007. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. Aquaculture, 272: 466-476.

CUZON G, R DOS SANTOS, M HEW & G POUULLAOUEC .1981. Use of *Spirulina* in a shrimp (*Penaeus japonicus*) diet. Journal of the World Mariculture Society, 12: 282-291.

DERNEKBASI S, H UNAL, I KARAYUNCEL & O ORAL. 2010. Effect of dietary supplementation of different rates of *Spirulina* (*Spirulina platensis*) on growth and feed conversion in Guppy (*Poecilia reticulata* Peters, 1860) Journal Animal and Veterinarian Advances, 9: 1395-1399.

DESTOUMIEUX D, P BULET, D LOEW, A VAN DORSSELAER, J RODRIGUEZ & E BACHÈRE. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). Journal of Biological Chemistry. 272: 28398-28406.

DESTOUMIEUX D, M MUÑOZ, C COSSEAU, J RODRIGUEZ, P BULET, M COMPS & E BACHÈRE. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. Journal of Cell Science, 113: 461-469.

FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Roma. 231p.

FURTADO PS, LHS POERSCH & W WASIELESKY JR. 2011. Effect of calcium hydroxide, carbonate and sodium bicarbonate on water quality and zootechnical

performance of shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in bio-flocs technology (BFT) systems. *Aquaculture*, 321: 130-135.

GOYTORTÚA-BORES E, R CIVERA-CERECEDO, S ROCHA-MEZA & A GREEN-YEE. 2006. Partial replacement of red crab (*Pleurocondes planipes*) meal for fish meal in practical diets for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Effects on growth and in vivo digestibility. *Aquaculture*, 256: 414-422.

GÜROY D, B GÜROY, DL MERRIFIELD, S ERGÜN, AA TEKINAY & M YIĞIT. 2011. Effect of dietary *Ulva* and *Spirulina* on weight loss and body composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during a starvation period. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95: 320-327.

HABIB MAB, M PARVIN, TC HUNTINGTON & MR HASAN. 2008. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*. No. 1034. Rome. 33p.

HANEL R, D BROEKMANN, S DE GRAAF & D SCHNACK. 2007. Partial replacement of fishmeal by lyophilized powder of the microalgae *Spirulina platensis* in Pacific white shrimp diets. *The Open Marine Biology Journal*, 1: 1-5.

HENRIKSON R. 2009. *Earth food Spirulina: How this remarkable Blue-green algae can transform your health and our planet*, RoNo. re Enterprises Inc, Laguna Beach.USA. 180p.

HIRAHASHI T, M MATSUMOTO, K HAZEKI, Y SAEKI, M UI, M & T SEYA. 2002. Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *Int.Immunopharmacol.* 2: 423-434.

HOSE JE, GG MARTIN & AS GERARD. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *The Biological Bulletin*, 178: 33-45.

HU Q. 2004. Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products-Major Industrial Species. In: Richmond, A. (ed.). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science. Chap.12: 264-272.

JAIME-CEBALLOS B, H VILLAREAL, T GARCIA, L PÉRZ-JAR & E ALFONSO. 2005. Effect of *Spirulina platensis* meal as feed additive on growth,

survival and development in *Litopenaeus schmitti* shrimp larvae. *Revista de Investigaciones Marinas* 26: 235–241.

JAIME-CEBALLOS B, A HERNÁNDEZ-LLAMAS, T GARCIA-GALANO, & H VILLARREAL. 2006. Substitution of *Chaetoceros muelleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus schmitti* larvae. *Aquaculture* 260: 215-220.

JAIME-CEBALLOS B, R CIVERA-CERECEDO, H VILLARREAL, J GALINDO-LÓPEZ & L PÉREZ-JAR. 2007. Uso de la harina de *Spirulina platensis* como atrayente en el alimento para el camarón *Litopenaeus schmitti*. *Hidrobiológica*, agosto, año, año/vol. 17, número 002. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Distrito Federal, México. 113-117.

JAMES R, K SAMPATH, R THANGARATHINAM & J VASUDEVAN. 2006. Effect of dietary *Spirulina* level on growth, fertility coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus helleri*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 58: 97-104.

JIRAVANICHPAISAL P, BL LEE & K SÖDERHÄLL. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211: 213-236.

JOHANSSON MW, P KEYSER, K SRITUNYALUCKSANA & K SÖDERHÄLL, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191: 45-52.

JORY DE, TR CABRERA, DM DUGGER, D FEGAN, PG LEE, AL LAWRENCE, CJ JACKSON, RP MCINTOSH & J CASTAÑEDA. 2001. A global review of shrimp feed management: status and perspectives. BROWDY, CL & JORY,DE, (Eds.), *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*, The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 104-152.

JU ZJ, IP FORSTER, & WG DOMINY. 2009. Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 292: 237-243.

JU ZY, DF DENG, & WG DOMINY. 2012. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Boone, 1931). *Aquaculture*. 354-355: 50–55.

KAWABATA SI, T MUTA & S IWANAGA. 1996. The clotting cascade and defense molecules found in the hemolymph of the horseshoe crab. In: Söderhäll, K, S Iwanaga, GR Vasta, (eds). *New Directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publications, Fair Haven. 255-283.

KIRON V, W PHROMKUNTHONG, M HUNTLEY, JA ARCHIBALD & G DE SCHEEMAKER. 2012. Marine microalgae from refinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. *Aquaculture Nutrition*. 18: 521-531.

LEU JH, SJ LIN, JY HUANG, TC CHEN & CF LO. 2013. A model for apoptotic interaction between white spot syndrome virus and shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 34: 1011-1017.

LIN YC, CM TAYAG, CL HUANG, WC TSUI & JC CHEN. 2010. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. *Fish & shellfish immunology*, 29: 1092-1098.

LIN YC, JC CHEN , CC LI, WZW MORNI, ASN SUNAILI, YH KUO, YH CHANG, LL CHEN, WC TSUI, YY CHEN & CL HUANG. 2012. Modulation of the innate immune system in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long-term low-salinity exposure. *Fish & Shellfish Immunology*: 33, 324.

LIU H, K SÖDERHÄLL & P JIRAVANICHPAISAL. 2009. Antiviral immunity in crustaceans. *Fish & shellfish immunology*, 27: 79-88.

LORENZON S, M MARTINIS & EA FERRERO. 2011. Ecological Relevance of Hemolymph Total Protein Concentration in Seven Unrelated Crustacean Species from Different Habitats Measured Predictively by a Density-Salinity Refractometer. *Journal of Marine Biology*. 7p.

MARINHO-SORIANO E, MR CAMARA, T CABRAL & MA CARNEIRO. 2007. Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming. *Aquaculture Research*, 38: 182-187.

MERINO G, M BARANGE, C MULLON & L RODWELL. 2010. Impacts of global environmental change and aquaculture expansion on marine ecosystems. *Global Environmental Change* 20: 586-596.

MOREIRA LM, ADSR ROCHA, CLG RIBEIRO, R DA SILVA RODRIGUES & LA DE SOUZA SOARES. 2011. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Spirulina platensis*. African Journal of Food Science, 5: 799-805.

NANDEESHA MC, B GANGADHARA, JK MANISSERY & LV VENKATARAMAN. 2001. Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. Bio resource Technology, 80: 117-120.

OUIJIFARD A, J SEYFABADI, AA KENARI & M REZAEI. 2012. Fish meal replacement with rice protein concentrate in a practical diet for the Pacific white shrimp, (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). Aquaculture International, 20: 117-129.

PALMEGIANO GB, E AGRADI, G FORNERIS, F GAI, L GASCO, E RIGAMONTI, B SICURO & I ZOCCARATO. 2005. *Spirulina* as a nutrient source in diets for growing sturgeon (*Acipenser baeri*). Aquaculture Research, 36: 188-195.

PALMEGIANO GB, F GAI, F DAPRÀ, L GASCO, M PAZZAGLIA & PEIRETTI PG. 2008. Effects of *Spirulina* and plant oil on the growth and lipid traits of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) fingerlings. Aquaculture Research, 39: 587-595.

PAN LQ, FW Hu, FT Jing, & HJ Liu. 2008. The effect of different acclimation temperatures on the prophenoloxidase system and other defence parameters in *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology, 25: 137-142.

PASCUAL C, E ZENTENO, G CUZON, A SÁNCHEZ, G GAXIOLA, G TABOADA, J SUÁREZ, T MALDONADO & C ROSAS. 2004. *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. Aquaculture, 236: 431-450.

PATNAIK S, TM SAMOCHA, DA DAVIS, RA BULLIS & CL BROWDY. 2006. The use of HUFA-rich algal meals in diets for *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition.12: 395-401.

PRADHAN J, BK DAS, S SAHU, NP MARHUAL, AK SWAIN, BK MISHRA, & AE EKNATH. 2012. Traditional antibacterial activity of freshwater microalga *Spirulina platensis* to aquatic pathogens. Aquaculture Research, 43: 1287-1295.

QIANG H. 2004. Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products—Major Industrial Species. *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: Richmond A (Ed.) (2008). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Wiley-Blackwell.

RAMÍREZ-MORENO L & OLVERA-RAMIREZ R. 2006. Conocimientos acerca del alga *Spirulina (Arthrospira)*. *Interciencia*, vol.31 (n° 009), Venezuela.

RIJIRAVANICH A, CL BROWDY & B WITHYACHUMNARNKUL. 2008. Knocking down caspase-3 by RNAi reduces mortality in Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* challenged with a low dose of white-spot syndrome virus. *Fish & shellfish immunology*, 24: 308-313.

RODRIGUEZ J & LE MOULLAC G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, 191: 109-119.

ROSAS C, G CUZON, G GAXIOLA, C PASCUAL, G TABOADA, L ARENA, & A VANWORMHOUDT. 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 268: 47-67.

SARATHI M, VP AHMED, C VENKATESAN, G BALASUBRAMANIAN, J PRABAVATHY & AS HAMEED. 2007. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 271: 8-20.

SILVA-NETO J, AJP NUNES, H SABRY- NETO & MVC SAL. 2012. *Spirulina* meal has acted as a strong feeding attractant for *Litopenaeus vannamei* at a very low dietary inclusion level. *Aquaculture Research*, 43: 430-437.

SIRIRUSTANANUN N, JC CHEN, YC LIN, ST YEH, CH LIOU, LL CHEN, SS SIM & SL CHIEW. 2011. Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 31: 848-855.

SPOLAORE P, C JOANNIS-CASSAN, E DURAN & A ISAMBERT. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101:87-96.

SUZUKI T, T TAKAGI, T FURUKOHRI, K KAWAMURA & M NAKAUCHI. 1990. A calcium-dependent galactose-binding lectin from the tunicate *Polyandrocarpa misakiensis*. Isolation, characterization, and amino acid sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 1274-1281

TAYAG CM, YC LIN, CC LI, CH LIOU & JC CHEN. 2010. Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white

shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish & Shellfish Immunology, 28: 764-773.

TEIMOURI M, AK AMIRKOLAIE & S YEGANEH .2013. The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). World Journal of Fish and Marine Sciences 5: 194-202.

UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual and Guides 12, Intergovernmental Oceanographic Commission. Paris, France.

USHARANI G. 2013. *Spirulina* Cultivation A Review. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive, 3: 6.

WANG W & ZHANG X. 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. Fish & shellfish immunology, 25: 522-527.

WASIELESKY JR. W, H ATWOOD, A STOKES & CL BROWDY. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture ,258: 396-403.

WEIBEL ER. 1980. Stereological methods. London: Academic, 2: 253-257.

WONGPRASERT K, K KHANOBDEE, SS GLUNUKAM, P MEERATANA & B WITHYACHUMNARNKUL. 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. Diseases of aquatic organisms, 55: 3-10.