



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

Sais orgânicos como aditivos alimentares para camarão marinho
Litopenaeus vannamei

Tese apresentada como requisito a obtenção do título de doutor em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Walter Quadros Seiffert, Dr.
Co-orientador: Felipe do Nascimento Vieira, Dr.

Bruno Corrêa da Silva

Florianópolis
2014

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

da Silva, Bruno Corrêa

Sais orgânicos como aditivo alimentar para camarão marinho *Litopenaeus vannamei* / Bruno Corrêa da Silva ; orientador, Walter Quadros Seiffert ; co-orientador, Felipe do Nascimento Vieira. - Florianópolis, SC, 2014. 150 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Camarão branco do Pacífico. 3. butirato de sódio. 4. nutrição. 5. imunologia. I. Seiffert, Walter Quadros . II. Vieira, Felipe do Nascimento. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Sais orgânicos como aditivos alimentares para camarão marinho
Litopenaeus vannamei

Por

BRUNO CORRÊA DA SILVA

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

Dr. Walter Quadros Seiffert – *Orientador*

Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes

Dr. Dariano Krummenauer

Dra. Débora Machado Fraclossi

Dra. Margherita Anna Antônia Maria Barracco

Dr. Sérgio Winckler da Costa

Dedico à minha família, Bete minha mãe, Evilásio meu pai, meu irmão Eduardo e minha namorada Gabriela pelo apoio, encorajamento, amor e pelos inestimados ensinamentos que formaram meu caráter e edificam minha história.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Bernadete Corrêa da Silva, por todo apoio, amor e compreensão em todos os momentos difíceis da minha vida acadêmica e pessoal;

Ao meu irmão, Eduardo Corrêa da Silva, por me espelhar como exemplo de dedicação e perseverança profissional;

Ao meu pai, Evilásio José da Silva, pelo incentivo nos estudos que sempre me passou através de toda minha vida e pelo amor e carinho a mim destinados;

A minha namorada e companheira, Gabriela Scholante Delabary, por todo apoio, amor, carinho e paciência nos melhores e piores momentos desta caminhada;

Aos orientadores e amigos Walter Quadros Seiffert, Felipe do Nascimento Vieira e José Luiz Mourinho pela orientação e apoio em todo o projeto, assim como em minha vida acadêmica;

Aos amigos do laboratório; Jatobá, Gabriel, Marcello, Gabi, Norha, Mari, Scheila, Carlos; pelo apoio e amizade durante a realização do projeto;

A todos os funcionários do Laboratório de Camarões Marinhos, em especial Ilson, David e Carlos, pela convivência e prestatividade;

A todos os professores e funcionários do Departamento de Aquicultura e do Programa de Pós Graduação em Aquicultura, em especial ao Carlito, pela atenção e prestatividade;

Ao professor e amigo Mauricio Laterça Martins, pelo apoio no projeto e ensinamentos durante minha vida acadêmica;

Ao Dr. Hector Nolasco Soria e Patricia Hinojosa Baltazar do Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), pelo apoio ao projeto e todos os ensinamentos durante o doutorado sanduíche;

A minha amiga Sandra de La Paz, ao amigo Dr. Francisco Magállon-Barajas e sua filha Paola Magallón Servín pela amizade e apoio durante o doutorado sanduíche no CIBNOR, México;

Ao MPA, FINEP, CNPq e CAPES por parte do apoio financeiro concedido para a realização dos estudos;

Em fim, a todos que ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho.

RESUMO

Os ácidos orgânicos e seus sais podem ser utilizados como aditivos promotores de crescimento na produção animal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de sais orgânicos na criação de camarões marinhos, auxiliando na nutrição e saúde de *Litopenaeus vannamei*. No primeiro estudo, após avaliação de seis sais de sódio (formiato, acetato, propionato, lactato, butirato e citrato) pode-se observar que os sais orgânicos possuem atividade inibitória contra vibrios patogênicos para camarões marinhos. Além disso, a atratividade e consumo de dietas comerciais aumentaram com a suplementação de propionato e butirato. A suplementação de propionato também aumentou a digestibilidade de energia e fósforo das dietas para o *L. vannamei*. No ensaio de crescimento em água clara, os camarões alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de propionato e butirato (0,5 a 2%) também apresentaram modificações na microbiota intestinal e aumento do ganho de peso. A suplementação de 2% de butirato em dietas para camarões marinhos também melhorou a eficiência alimentar e sobrevivência do cultivo em água clara, além da retenção de nitrogênio e taxa de eficiência proteica. No cultivo do *L. vannamei* em bioflocos a suplementação de 2% de butirato de sódio aumentou a sobrevivência e produtividade, além de diminuir a concentração de bactérias heterotróficas totais e vibrios no intestino, aumentar o número de hemócitos granulares e hialinos e o título de aglutinação. Portanto, o butirato de sódio possui potencial para ser usado com promotor de crescimento em cultivo de *L. vannamei* melhorando o balanço da flora bacteriana intestinal e índices zootécnicos do cultivo de camarões marinhos em diferentes sistemas, podendo atuar também como estimulante do sistema imunológico.

Palavras-chave: Camarão branco do Pacífico, ácidos orgânicos, butirato de sódio, nutrição, imunologia.

ABSTRACT

ORGANICS SALTS AS FEED ADDITIVE FOR MARINE SHRIMP *Litopenaeus vannamei*

Organic acids or their salts can be used as growth promoters in animal production. The objective of this study was to evaluate the use of organic salts in the marine shrimp culture, aiding in nutrition and health of *Litopenaeus vannamei*. In the first study, sodium salts (formate, acetate, propionate, lactate, butyrate and citrate) had inhibitory activity against pathogenic vibrios for marine shrimp. Moreover, the attractiveness and feed intake of the commercial diets increased with propionate and butyrate supplementation. Propionate supplementation also increased energy and phosphorus digestibility for *L. vannamei*. Under clear water, shrimp fed diets supplemented with different concentrations of propionate and butyrate (0.5 to 2%) also showed changes in the intestinal microbiota and higher growth. Supplementation of 2% butyrate in diets for marine shrimp also improved feed efficiency, final shrimp survival, nitrogen retention and protein efficiency rate. Under biofloc system, shrimp fed diets supplemented with 2% sodium butyrate increased survival and productivity, reduced the concentration of total heterotrophic bacteria and vibrios in the intestine, while increasing the number of granular and hyaline hemocytes, and agglutination titre. Thus, it can be concluded that sodium butyrate has the potential to act as growth promoter in *L. vannamei* diets, and improve the balance of intestinal bacterial flora and shrimp growth performance under different systems, and act as stimulant of the immune system.

Keywords: Pacific white shrimp, organic acids, sodium butyrate, nutrition, immunology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mecanismo da atividade bacteriostática de ácidos orgânicos (ácido butírico, como exemplo). Os ácidos orgânicos na sua forma indissociável atravessam a membrana celular (1), e dissociam-se no citoplasma (2). Consequentemente, as bactérias têm que gastar energia para exportar o excesso de prótons (3). Adaptado de Defoirdt et al. (2009). 31
- Figura 2** – Desenho esquemático das participações dos ácidos graxos de cadeia curta no metabolismo animal. 32
- Figura 3** – Porcentagem de lixiviação (%), em diferentes tempos, dos sais orgânicos em dieta comercial para camarões marinhos. Média \pm desvio padrão. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%..... 66
- Figura 4** – Análise da contagem bacteriana intestinal de camarões marinhos alimentados com dietas suplementadas com 2% de diferentes sais orgânicos. Média \pm desvio padrão. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%..... 67
- Figura 5** – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S da cepa de *Vibrio* isolado de hemolinfa de camarões em surto de mortalidade e utilizado nos desafios experimentais (CPQBA 378-12-DRM 01) e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e GenBank. 85
- Figura 6** - Dendograma de similaridade dos perfis de bandas das amostras de DNA bacteriano amplificado, extraído do intestino de camarões *L. vannamei* cultivados em água clara com suplementação dietética de propionato de sódio e butirato de sódio em diferentes concentrações..... 93
- Figura 7** – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S da cepa de *Vibrio* isolado de hemolinfa de camarões em surto de mortalidade e utilizado nos desafios

experimentais (CPQBA 378-12-DRM 01) e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e GenBank. 114

Figura 8 – Contagem bacteriológica do trato intestinal de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%. 120

Figura 9 – Mortalidade acumulada (%) de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB) e desafiado com 1×10^5 unidades formadoras de colônia por camarão de *Vibrio* sp. (DL₁₀). 123

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Composição centesimal da dieta comercial, Guabi 35 EXT (São Paulo, Brasil), e dietas experimentais utilizada nos ensaios. 57
- Tabela 2** – Análise da mínima concentração inibitória (MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*) (%) dos sais orgânicos frente a patógenos de camarões marinhos com valores de pH de 6,2 e 7,1. 63
- Tabela 3** – Frequência de escolhas positivas (%) dos camarões *Litopenaeus vannamei* mantidos no labirinto em Y alimentados com dietas suplementadas com 2% de sais orgânicos. 64
- Tabela 4** - Número de comparações e porcentagens (%) de escolhas positivas e rejeições dos camarões *Litopenaeus vannamei* mantidos no labirinto em Y alimentados com dietas suplementadas com 2% de sais orgânicos. 65
- Tabela 5** – Índice de seleção da distância ao ideótipo (IDI) dos sais orgânicos utilizados como aditivos alimentares para o camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*. 68
- Tabela 6** – Porcentagem de consumo diário (%) e coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) do camarão marinho, *Litopenaeus vannamei* alimentado com dieta comercial suplementadas com 2% de sais orgânicos. 69
- Tabela 7** – Composição da dieta referência utilizada no ensaio de crescimento em água clara com *Litopenaeus vannamei*. 81
- Tabela 8** – Composição centesimal (g.kg⁻¹), pH e estabilidade na água (%) das dietas avaliadas no ensaio de crescimento em água clara com *Litopenaeus vannamei*. 82
- Tabela 9** – Parâmetros zootécnicos de *Litopenaeus vannamei* cultivado em água clara com suplementação dietética de propionato de sódio e butirato de sódio em diferentes concentrações. 89
- Tabela 10** – Retenção corporal de nitrogênio e fósforo e taxa de utilização proteica de *Litopenaeus vannamei* cultivado em água clara com suplementação dietética de propionato de sódio e butirato de sódio em diferentes concentrações. 90

Tabela 11 – Contagem bacteriológica do trato intestinal de <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado em água clara com suplementação dietética de propionato de sódio e butirato de sódio em diferentes concentrações e em dois períodos de alimentação.	92
Tabela 12 – Sobrevivência de <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivados em água clara com suplementação dietética de propionato de sódio e butirato de sódio em três diferentes concentrações (0,5; 1 e 2%) e desafiados intramuscular com 100 µL de <i>Vibrio</i> sp. contendo $2,92 \times 10^5$ unidades formadoras de colônia por camarão (DL ₅₀).	94
Tabela 13 – Parâmetros hematológicos e imunológicos de <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado em água clara com suplementação dietética de propionato de sódio e butirato de sódio em diferentes concentrações.	96
Tabela 14 - Formulação e composição centesimal das dietas experimentais utilizados na engorda experimental de <i>Litopenaeus vannamei</i> em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB).	112
Tabela 15 – Parâmetros de qualidade de água na engorda experimental de <i>Litopenaeus vannamei</i> em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB).	117
Tabela 16 – Parâmetros zootécnicos na engorda experimental de <i>Litopenaeus vannamei</i> em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB).	118
Tabela 17 - Retenção corporal de nitrogênio e fósforo e taxa de utilização de proteína de <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB).	119
Tabela 18 – Parâmetros hemato-imunológicos de <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivado em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB).	122

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Efeitos dos ácidos orgânicos e seus sais na nutrição animal. Adaptado de Lückstädts (2008). 30
- Quadro 2** – Sumário de estudos científicos com ácidos orgânicos e seus sais na aquicultura. 35

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	7
RESUMO	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE QUADROS.....	17
CAPÍTULO I.....	25
INTRODUÇÃO GERAL: SAIS ORGÂNICOS COMO ADITIVO ALIMENTAR PARA CAMARÃO MARINHO <i>Litopenaeus vannamei</i>	25
1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1 ADITIVOS ALIMENTARES PARA CAMARÕES MARINHOS.....	28
1.1.1 <i>Probióticos</i>	28
1.1.2 <i>Prebióticos</i>	29
1.1.3 <i>Imunoestimulantes e fitoterápicos</i>	29
1.1.4 <i>Ácidos orgânicos</i>	30
1.2 EFEITOS DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS NA DIETA E NOS ANIMAIS	30
1.2.1 <i>Efeitos na dieta</i>	30
1.2.2 <i>Efeito antimicrobiano no trato intestinal</i>	31
1.2.3 <i>Efeito no metabolismo</i>	32
1.2.4 <i>Efeitos na disponibilidade de minerais</i>	32
1.3 USO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E SEUS SAIS NA PRODUÇÃO ANIMAL....	33
1.4 USO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E SEUS SAIS NA AQUICULTURA.....	35
1.4.1 <i>Uso de ácidos orgânicos e seus sais na carcinicultura</i>	42
1.5 CULTIVO SUPERINTENSIVO EM SISTEMA DE BIOFLOCOS	43
2 JUSTIFICATIVA	47

3	OBJETIVO.....	49
	OBJETIVO GERAL	49
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4	FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS.....	49
	CAPÍTULO II.....	51
	SELEÇÃO DE SAIS DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR MÚLTIPLOS CRITÉRIOS PARA NUTRIÇÃO DE CAMARÕES MARINHOS	51
5	RESUMO	52
6	ABSTRACT.....	53
7	INTRODUÇÃO	54
8	MATERIAL E MÉTODOS	55
8.1	SAIS ORGÂNICOS.....	55
8.2	MATERIAL BIOLÓGICO.....	56
8.3	INIBIÇÕES DE PATÓGENOS BACTERIANOS <i>IN VITRO</i>	56
8.4	PREPARO DAS DIETAS EXPERIMENTAIS	58
8.5	TESTES DE ATRATIVIDADE DAS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	58
8.6	ESTABILIDADE DOS SAIS ORGÂNICOS NA DIETA	59
8.7	ALTERAÇÕES DA CONTAGEM BACTERIANA INTESTINAL.....	59
8.8	CONSUMO DAS DIETAS EXPERIMENTAIS	60
8.9	DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE.....	60
8.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	61
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
9.1	DETERMINAÇÃO DO PH DAS DIETAS E INTESTINAL.....	62
9.2	INIBIÇÃO DE PATÓGENO BACTERIANOS <i>IN VITRO</i>	63
9.3	TESTES DE ATRATIVIDADE DAS DIETAS EXPERIMENTAIS.....	64
9.4	ESTABILIDADE DOS SAIS ORGÂNICOS NAS DIETAS.....	65

9.5 ALTERAÇÃO DA CONTAGEM BACTERIANA INTESTINAL	66
9.7 CONSUMO E DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE.....	68
10 CONCLUSÃO.....	70
11 AGRADECIMENTOS	70
12 REFERÊNCIAS	70
CAPÍTULO III.....	75
BUTIRATO E PROPIONATO MELHORAM DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE <i>Litopenaeus vannamei</i>	75
13 RESUMO	76
14 ABSTRACT	77
15 INTRODUÇÃO.....	78
16 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
16.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	80
16.2 PREPARO E ANÁLISE DAS DIETAS	80
16.3 ENSAIO DE CRESCIMENTO	83
16.4 AVALIAÇÕES DA MICROBIOTA INTESTINAL.....	84
16.5 DESAFIO EXPERIMENTAL	85
16.6 ANÁLISES HEMATO-IMUNOLÓGICAS	86
16.7 ANÁLISES DOS DADOS.....	87
17 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
17.1 PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA.....	88
17.2 PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS.....	88
17.3 UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO	90
17.4 COMUNIDADE BACTERIANA INTESTINAL	91
17.5 DESAFIO EXPERIMENTAL	93
17.6 ANÁLISES HEMATO-IMUNOLÓGICA.....	94
18 CONCLUSÃO.....	97

19	AGRADECIMENTOS.....	97
20	REFERÊNCIAS.....	98
CAPÍTULO IV.....		105
SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE BUTIRATO DE SÓDIO E POLIHIDROXIBUTIRATO NO DESEMPENHO DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO EM SISTEMA DE BIOFLOCOS.....		105
21	RESUMO.....	106
22	ABSTRACT.....	107
23	INTRODUÇÃO.....	108
MATERIAL E MÉTODOS.....		110
24.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	110
24.2	PREPARAÇÃO E ANÁLISE DAS DIETAS.....	110
24.3	ENSAIO DE CRESCIMENTO.....	110
24.4	AValiação DOS PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS.....	113
24.5	CONTAGEM BACTERIOLÓGICA.....	113
24.6	DESAFIO EXPERIMENTAL.....	113
24.7	ANÁLISES HEMATO-IMUNOLÓGICAS.....	115
24.8	ANÁLISES DOS DADOS.....	116
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		116
25.1	PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA.....	116
25.2	PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS.....	118
25.3	UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO.....	119
25.4	CONTAGEM BACTERIOLÓGICA.....	120
25.5	PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS.....	121
25.6	MORTALIDADE ACUMULADA.....	123
24	CONCLUSÕES.....	124
25	AGRADECIMENTOS.....	124

26	REFERÊNCIAS	124
	CONCLUSÕES GERAIS	131
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	135
	ANEXO I	145
	ANEXO II	146
	ANEXO III.....	147
	ANEXO IV.....	148
	ANEXO V.....	149
	ANEXO VI.....	150

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL: SAIS ORGÂNICOS COMO ADITIVO ALIMENTAR PARA CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*

1. INTRODUÇÃO

Com uma produção de aproximadamente 84 milhões de toneladas em 2011, a aquicultura já é uma atividade relevante para produção mundial de proteína de origem animal. Dentre os continentes a Ásia lidera com 90% desta produção, produzindo mais de 76 milhões de toneladas de pescado (FAO-FISHSTAT, 2013). Segundo os últimos dados oficiais da aquicultura brasileira, a atividade no país cresceu 31,1% em 2011 em relação ao ano anterior, produzindo um pouco mais de 628 mil toneladas de pescado, onde 65,7 mil toneladas provêm da carcinicultura (MPA, 2011). Mundialmente o cultivo de crustáceos representa 7,0% da produção aquícola, sendo produzido, preferencialmente em regiões tropicais com águas salobras (FAO-FISHSTAT, 2013).

Contudo, a carcinicultura vem enfrentando algumas dificuldades para expandir sua produção. Dentre os fatores que mais afetam a sua expansão estão os problemas com enfermidades. As enfermidades de camarões podem ser causadas por vírus, bactérias intracelulares (*rickettsial like bacteria*), enterobactérias, fungos e protozoários (MORALES; CUELLAR-ANJEL, 2008). No entanto, até os últimos anos, as viroses têm sido responsáveis pelas maiores perdas econômicas na carcinicultura mundial e brasileira.

Como exemplos, temos a Síndrome de Taura (TSV, *Taura Syndrome Virus*) que surgiu no Equador e a Síndrome da Mancha Branca (WSSV, *White Spot Syndrome Virus*) que surgiu na Ásia, ambas no início dos anos 90 (LIGHTNER et al., 2012a). Lightner (2003) estima que até 2001 as perdas econômicas causadas apenas pelo WSSV ultrapassaram US\$ 1 bilhão nas Américas e na Ásia foram de US\$ 4-6 bilhões.

Atualmente a carcinicultura também vem lutando com o surgimento de uma nova doença que têm causado enormes prejuízos na Ásia. Ela é conhecida popularmente como Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS, *Early Mortality Syndrome*) também caracterizada como Síndrome da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPNS, *Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome*). Esta foi primeiramente relatada na China em 2009, expandindo-se para Vietnã e Malásia em 2011 (LIGHTNER et al., 2012b), sendo identificada este ano em mortalidades massivas no México (MAGALLÓN-BARAJAS, 2013).

Durante um longo tempo, a etiologia desta doença era desconhecida, identificado seu agente patológico apenas em 2013; uma cepa de *Vibrio parahaemolyticus* altamente patogênico, que libera

toxinas que causam disfunções no hepatopâncreas e conseqüentemente as mortalidades de juvenis de *Litopenaeus vannamei*, 20 a 30 dias após o povoamento de pós-larvas nos viveiros (LIGHTNER et al., 2012b; TRAN et al., 2013).

Além dos problemas causados pela EMS, outras as bactérias do gênero *Vibrio* também são responsáveis por mortalidades nas larviculturas de camarões (VANDENBERGHE et al., 1998) e na intensificação de mortalidades quando associada às doenças virais, como a WSSV (PHUOC et al., 2009).

Os vibrios estão presentes em grandes quantidades nos meios aquáticos e possuem grande representatividade na comunidade microbiana que coloniza o trato intestinal de camarões marinhos, podendo constituir cerca de 60% da microflora bacteriana intestinal (LIU et al., 2011a).

Por estes motivos, o uso profilático de quimioterápicos com intuito de prevenir mortalidades, ou até mesmo atuar como promotores de crescimento é uma prática comum na aquicultura (SERRANO, 2005). No entanto, o uso de quimioterápicos, entre eles os antibióticos, ocasionam diversos problemas importantes que devem ser levado em consideração. Em *Penaeus monodon*, o uso de oxitetraciclina, cloranfenicol, entre outros, resultou em deformidade no rosto, carapaça e cerdas (BATICADOS et al., 1990). Para o uso efetivo contra *V. campbellii*, doses de enrofloxacino acima de 20mg.L⁻¹ deveriam ser usadas, porém apresentam toxicidade para os estádios de protozoa 1 e 2 (SOTO-RODRIGUEZ; ARMENTA; GOMEZ-GIL, 2006).

Além disso, os resíduos de alimento e fezes contendo antibiótico podem contaminar o solo do ambiente de cultivo ou animais filtradores que se encontram neste ambiente. Esta contaminação pode resultar no aparecimento de cepas resistentes, entre elas, bactérias patogênicas para os animais aquáticos ou até mesmo para os seres humanos (SKJERMO; VADSTEIN, 1999; VERSCHUERE et al., 2000; HOLMSTRÖM et al., 2003; CABELLO, 2006). Por exemplo, em 1992 houve uma epidemia de cólera na América Latina, causada por uma cepa de *V. cholerae* resistente a diversos antibióticos. A resistência desta cepa foi relacionada por alguns pesquisadores pelo contato com outras cepas resistentes depois do uso indiscriminado de antibióticos em fazendas de camarões marinhos no Equador (SMITH, 2007).

Aliando este problema aos resíduos deixados na carne do camarão, diversos países baniram o uso de antibióticos na carcinicultura (VINE; LEUKES; KAISER, 2006). A União Europeia também proibiu,

a partir de janeiro de 2006, o uso de antibióticos na produção animal (LÜCKSTÄDTS, 2006). No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013) já proibiu o uso de diversos antibióticos; cloranfenicol e nitrofuranos (IN nº 09, 27/06/2003), quilononas e sulfonamidas (IN nº 26, 9/07/2009), espiramicina e eritromicina (IN nº 14, 17/05/2012); como aditivo alimentar na produção animal.

Com isso, há um aumento nas buscas por substâncias alternativas aos antibióticos que atuem na inibição de patógenos, prevenindo enfermidades, bem como promotores de crescimento (LIM; LÜCKSTÄDTS; KLESIUS, 2010), além da busca por sistemas de cultivo mais biosseguros, como por exemplo, o cultivo superintensivo em bioflocos microbiano (WASIELESKY et al., 2006),

1.1 Aditivos alimentares para camarões marinhos

Dentre os aditivos mais estudados na aquicultura temos os probióticos, prebióticos, imunoestimulantes, e mais recentemente substâncias fitogênicas e ácidos orgânicos (ENCARNAÇÃO, 2010).

A seguir será dado enfoque breve no uso apropriado destes aditivos alimentares e como eles podem atuar na nutrição e saúde dos camarões marinhos. Para isto, serão discutidos suas definições e os mecanismos de ação.

1.1.1 Probióticos

Devido a grande interação dos microrganismos do meio aquático e da microbiota intestinal dos animais cultivados, há uma grande discussão sobre o conceito de probiótico na aquicultura. No entanto, Verschuere et al. (2000) definiram os probióticos como “microrganismos vivos que ao serem ministrados a tanques de cultivo atuam benéficamente no organismo aquático de interesse, seja melhorando o consumo ou absorção da dieta, o sistema imunológico, balanço de bactérias no trato digestivo ou o ambiente de cultivo (viveiro)”.

Atualmente, os principais grupos de bactérias utilizadas como probiótico na carcinicultura marinha são *Bacillus* (BALCÁZAR et al., 2006; ZHOU; WANG; LI, 2009a), *Vibrio* (GULLIAN; THOMPSON; RODRIGUEZ, 2004; RODRÍGUEZ et al., 2007) e *Lactobacillus* (CASTEX et al., 2008; VIEIRA et al., 2008, 2010; KONGNUM; HONGPATTARAKERE, 2012). Dentre os mecanismos de ação destes microrganismos podemos observar inibição de patógenos, produção de

enzimas digestivas e melhoria do sistema imunológico (MOURIÑO et al., 2012).

1.1.2 Prebióticos

Prebióticos são ingredientes não digestíveis, utilizados nas dietas que beneficiam o hospedeiro, estimulando o crescimento ou mesmo ativando o metabolismo de uma ou mais cepas de bactérias presentes no trato intestinal, regulando assim o balanço da microbiota benéfica no hospedeiro. Os gêneros bacterianos mais comumente associados à utilização de prebióticos são os *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (GIBSON, 2004). Os prebióticos mais utilizados na aquicultura são os manoligossacarídeos (MOS), frutoligossacarídeos (FOS) e inulina (RINGO et al., 2010).

Assim como o probiótico, os prebióticos podem melhorar o balanço da microbiota intestinal e respostas imunológicas (YOUSEFIAN; AMIRI, 2009). Li et al. (2007) verificaram o aumento na contagem de hemócitos e de espécies reativas de oxigênio (ROIs, *reactive oxygen intermediates*) após a suplementação dietética de 0,8% de FOS para *L. vannamei*. Outro estudo também mostrou a melhora do ganho de peso e conversão alimentar de *L. vannamei* após a suplementação de 0,04% de FOS (ZHOU; DING; HUIYUAN, 2007).

1.1.3 Imunoestimulantes e fitoterápicos

Devido à impossibilidade de vacinar camarões, por a sua falta de sistema imunológico adaptativo, os imunoestimulantes e fitoterápicos são utilizados com intuito de estimular o sistema imune inato do camarão antes de uma possível infecção. Entre os compostos imunoestimulantes destacam-se muitos derivados de paredes celulares de microrganismos, como peptidoglicanos (PGs), lipopolissacarídeos (LPS) e os β -glucanos (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008, p.202). O efeito estimulante de β -glucanos, derivados da parede de leveduras, já foi comprovado em diversos estudos com *L. vannamei* melhorando parâmetros imunológicos e sobrevivência após desafios experimentais (SIRIPAISAN et al., 2006; CHANG et al., 2011).

Alguns fitoterápicos também têm se mostrado com efeitos imunoestimulantes em camarões. Extratos das algas *Gelidium amansii*, *Spirulina platensis* e *Sargassum fusiforme* melhoraram parâmetros imunológicos de camarões marinhos e aumentaram a sobrevivência após desafio experimental com *Vibrio* (HUANG; ZHOU; ZHANG, 2006; FU et al., 2007; TAYAG et al., 2010). O uso de extrato de ginseng (*Panax*

ginseng) também aumentou a expressão de genes imunológicos de *L. vannamei* (LIU et al., 2011b).

1.1.4 Ácidos orgânicos

Estudos com cepas de bactérias ácido lácticas comprovaram que seu potencial de inibição contra bactérias patogênicas se deve muito pela produção de ácidos orgânicos, como o ácido acético e láctico (VAZQUEZ; GONZALEZ; MURADO, 2005). Contudo, relatos de estudos com ácidos orgânicos ou seus sais em camarões marinhos são limitados.

Os ácidos orgânicos exercem efeitos sobre o desempenho zootécnico dos animais durante os cultivos através de mecanismos distintos, que serão abordados no tópico a seguir.

1.2 Efeitos dos ácidos orgânicos na dieta e nos animais

Os ácidos orgânicos exercem diferentes efeitos na dieta, no trato intestinal e metabolismo do animal cultivado (Quadro 1).

Quadro 1 – Efeitos dos ácidos orgânicos e seus sais na nutrição animal. Adaptado de Lückstädt (2008).

Local de ação	Forma efetiva	Efeitos
Dieta	H ⁺	Redução do pH
		Desnaturação de proteínas Redução no crescimento microbiano
Trato intestinal	H ⁺ e Ânion	Efeito antibacteriano
		Mudança na microbiota do trato
	H ⁺	Redução no pH do estômago e duodeno
		Aumento da atividade de pepsina
Ânion	Disponibilização de cátions (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺)	
Metabolismo	H ⁺ e Ânion	Fonte de energia

H⁺ - Forma não ionizada. Ânion – Forma ionizada.

1.2.1 Efeitos na dieta

Na dieta, os ácidos orgânicos funcionam como agentes de conservação, reduzindo o pH do alimento, inibindo o crescimento microbiano e diminuindo a absorção de organismos patogênicos (LÜCKSTÄDT, 2007). Estes compostos também podem ser utilizados na elaboração de silagem de pescados, trazendo efeitos benéficos, como

o auxílio na digestão das proteínas pela redução do pH, que em valores baixo são desnaturadas, aumentando a área de atuação das enzimas (LÜCKSTÄDTTS, 2008). Eles também podem ser utilizados para modificar o pH das dietas e levá-las a valores de pHs desejados para um melhor aproveitamento dos nutrientes. Contudo, estudos avaliando o efeito de diferentes valores de pHs em dietas para animais aquáticos são escassos.

1.2.2 Efeito antimicrobiano no trato intestinal

No trato intestinal dos animais, os ácidos orgânicos inibem o crescimento de bactérias, principalmente as Gram-negativas. Os ácidos na sua forma não ionizada conseguem entrar pela parede das bactérias e realizar a liberação de prótons no citoplasma, onde estas consomem uma grande quantidade de ATP para exportar os prótons do interior da célula para fora, tentando manter o equilíbrio do pH intracelular. Esse gasto de ATP resulta em uma depleção de energia celular e posteriormente a morte (Figura 1). (LÜCKSTÄDTTS, 2008, DEFOIRD et al., 2009).

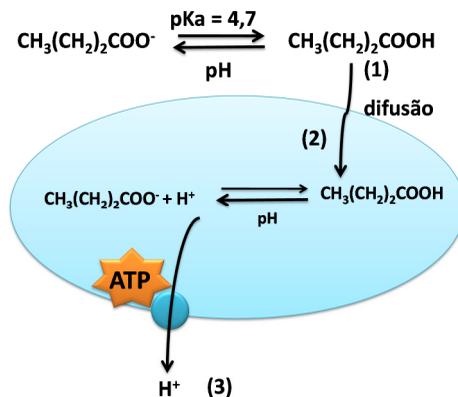


Figura 1 - Mecanismo da atividade bacteriostática de ácidos orgânicos (ácido butírico, como exemplo). Os ácidos orgânicos na sua forma indissociável atravessam a membrana celular (1), e dissociam-se no citoplasma (2). Conseqüentemente, as bactérias têm que gastar energia para exportar o excesso de prótons (3). Adaptado de Defoirdt et al. (2009).

Apesar desta ser a forma mais citada por diversos autores, a liberação de prótons no citoplasma não é o único mecanismo de inibição dos ácidos orgânicos. Outro mecanismo bem conhecido na ecologia microbiana do solo é a liberação de ácidos orgânicos, como citrato,

malato e oxalato, pelas bactérias presentes em simbiose nas raízes das plantas leguminosas. Estes ácidos orgânicos formam complexos quelantes com os minerais, principalmente com o ferro, competindo assim com sideróforos produzidos por bactérias patogênicas, limitando a disponibilidade destes micronutrientes para estas bactérias, inibindo seu crescimento (JONES, 1998; CARDOSO; NOGUEIRA, 2007, p.88).

1.2.3 Efeito no metabolismo

No metabolismo animal, os ácidos orgânicos também podem afetar a ação de enzimas digestivas, como a pepsina, através da redução do pH da dieta (LÜCKSTÄDT, 2008), ou ainda, a presença destes ácidos ou seus sais podem alterar a atividade *in vitro* de tripsina e quimotripsina de camarão marinho *L. vannamei* (NOLASCO, 2013).

Ainda podem servir como fonte de energia para o animal, pois são componentes de diversas rotas metabólicas. Enquanto o ácido láctico pode promover a disponibilização rápida de piruvato, o ácido cítrico ou fumarato podem entrar como intermediário do ciclo de Krebs. Ainda, os ácidos graxos de cadeia curta, como o butirato, podem ser direcionados para produzir energia pelo ciclo dos ácidos carboxílicos, assim como outros ácidos graxos de cadeia longa (Figura 2) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007).

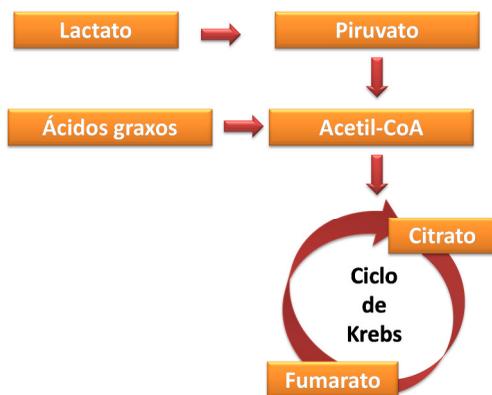


Figura 2 – Desenho esquemático das participações dos ácidos graxos de cadeia curta no metabolismo animal.

1.2.4 Efeitos na disponibilidade de minerais

Outros estudos com ácidos orgânicos relatam a ação destes no aumento da disponibilização e digestibilidade de minerais, podendo

reduzir a excreção de fósforo (P) e nitrogênio (N), diminuindo a carga de resíduos de efluentes da aquicultura (vide revisão de PANDEY; SATOH, 2008).

De acordo com a origem da fonte proteica, pode ocorrer inibição da absorção de minerais, devido à presença do fitato e fosfato tricálcico em ingredientes de origem vegetal. Estes inibidores atrapalham na absorção do N e P, além de vários outros minerais, como potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), zinco (Zn), ferro (Fe) e cobre (Cu), que também fazem parte dos agrupamentos (LEINER, 1994; BARUAH et al., 2007; PANDEY; SATOH, 2008). A melhoria na digestibilidade dos minerais devido à utilização de ácidos orgânicos ou seus sais pode ocorrer de três formas: (i) baixa do pH, resultando em uma maior dissociação dos compostos minerais, (ii) redução da taxa de esvaziamento do estômago, e (iii) a formação de complexos minerais quelados, que são facilmente absorvidas no intestino (HOSSAIN; PANDEY; SATOH, 2007).

1.3 Uso de ácidos orgânicos e seus sais na produção animal

Durante a última década, uma maior compreensão foi adquirida da importância da microbiota intestinal de animais aquáticos em relação a sua nutrição e saúde. Há evidências de que a complexa ecologia microbiana do intestino fornece benefícios nutricionais e proteção contra patógenos. Devido a este fato, é crescente o número de trabalhos avaliando os efeitos dos aditivos alimentares com intuito de promover melhorias na digestão de nutrientes, na saúde e no desempenho zootécnico dos animais (ENCARNAÇÃO, 2010). Por estes motivos, há um aumento de pesquisas com os ácidos orgânicos e seus sais nos últimos anos, sendo o diformiato de potássio (KDF), a primeira substância aprovada pelo Conselho Europeu para uso como promotor de crescimento não antibiótico na produção animal (NG et al., 2010).

A suplementação de dietas com ácidos orgânicos para aves e suínos já foi amplamente estudada, com resultados consistentes. O uso de misturas de ácidos orgânicos e inorgânicos é comum em dietas para as fases pré e pós-desmame de suíno, com o objetivo de auxiliar a digestão proteica e controlar a proliferação bacteriana intestinal. Os ácidos orgânicos resultam em maior consumo da dieta, maior crescimento, além de benefícios à mucosa intestinal, similar á dos antibióticos promotores de crescimento. Possivelmente, a inibição da colonização por microrganismos traga benefícios à mucosa intestinal favorecendo a estrutura das vilosidades. Esse efeito pode ser ocasionado pela redução das perdas por descamação, causado pelas toxinas de

bactérias patogênicas, proporcionando aumento do tamanho de vilosidades e, conseqüentemente, maior área de absorção de nutrientes e saúde dos animais (PARTANEN; MROZ, 1999; VIOLA; VIEIRA, 2007).

Em suínos, a suplementação dietética de diferentes ácidos orgânicos têm mostrado melhorias em diversos parâmetros analisados. A suplementação de ácido benzóico aumentou o ganho de peso, o consumo alimentar e a digestibilidade do nitrogênio total (HALAS et al., 2010). Outro estudo com ácido fórmico aumentou a eficiência da fitase na absorção do fósforo (BLANK et al., 2012). A suplementação de 0,3% de butirato de sódio para reprodutores durante a gestação de suínos melhorou os parâmetros zootécnicos de leitões (LU; SU; AJUWON, 2012).

Na produção de frango de corte a suplementação com butirato de sódio melhorou a imunidade e o ganho de peso (ZHANG et al., 2011). Em outros estudos a suplementação de 2-3% de ácido butírico, fumárico ou láctico na engorda de frangos aumentaram o ganho de peso e a altura das vilosidades intestinais (ADIL et al., 2010, 2011).

O uso do ácido butírico ou butirato de sódio para melhoria da saúde intestinal é destaque no meio científico, e seus efeitos em animais terrestres e humanos são mais estudados. O butirato, além de fornecer energia para as células epiteliais, aumenta a proliferação e diferenciação destas células aumentando a altura das vilosidades intestinais (GALFI; BOKORI, 1990). Na revisão de Hamer et al. (2008) sobre a função do butirato na saúde do colón intestinal de humanos, os autores citam que ele possui efeitos na inibição da carcinogênese do cólon, efeito anti-inflamatório, inibe o estresse oxidativo, aumenta as barreiras de defesa do intestino e aumenta a saciedade.

Nos últimos anos, diversos aditivos alimentares comerciais foram desenvolvidos, possuindo diferentes ácidos orgânicos ou seus sais como princípio ativo. Dentre as grandes empresas que possuem estes produtos estão a Biomin, Nutri-Ad e Novus. Muitos destes produtos são constituídos de misturas de diferentes ácidos e sais orgânicos e inorgânicos, além de fitoterápicos e imunoestimulantes.

Entre os ácidos orgânicos mais utilizados comercialmente estão o ácido fórmico, propiônico, láctico, butírico e cítrico. Alguns destes produtos possuem revestimentos derivados de óleos vegetais, que possibilitam a liberação do seu princípio ativo somente no intestino dos animais cultivados. Além disso, na aquicultura, esses revestimentos ajudam a proteger contra a lixiviação dos ácidos ou sais orgânicos.

1.4 Uso de ácidos orgânicos e seus sais na aquicultura

Recentemente iniciaram estudos sobre o uso dos ácidos orgânicos e seus sais em animais aquáticos (Quadro 2).

Quadro 2 – Sumário de estudos científicos com ácidos orgânicos e seus sais na aquicultura.

Tipo e forma do ácido	Concentração na dieta	Espécie	Resultado	Referência
Lactato	1%	<i>Salvelinus alpinus</i>	Melhora do crescimento e conversão alimentar, diminuição da diarreia.	Ringo (1991); Ringo et al. (1994).
Ácido fórmico	0,4 e 1%	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Aumento da digestibilidade de P, Mg e Ca.	Vielma e Lall (1997).
Formiato + butirato (2:1)	1%	<i>O. mykiss</i>	Não houve efeitos benéficos.	Gao et al. (2011).
Ácido propiônico 30% + fórmico 20%	0,6%	<i>O. mykiss</i>	Mudança na microbiota intestinal.	Jaafard et al. (2013).
Diformiato de sódio (NaDF)	1%	<i>O. mykiss</i>	Aumento da digestibilidade de lipídeos, cinzas, proteínas, e aminoácidos essenciais.	Morken et al. (2011).
Diformiato de potássio (KDF)	1,2%	<i>Salmo salar</i>	Não alterou a digestibilidade, mas diminuiu a expansão do pelete e aumentou a dureza e durabilidade da dieta.	Morken et al. (2012).

Quadro 2 – Continuação.

Polihidroxi-bu- rato (PHB)	2 a 5%	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Melhoria do ganho de peso e conversão, diminuição do pH intestinal, e alteração da comunidade bacteriana intestinal.	Schryver et al. (2010).
Butirato protegido	0,3%	<i>Sparus aurata</i>	Aumento do ganho de peso e alteração do perfil metabólico do intestino.	Robles et al. (2013).
Ácido cítrico, láctico, acético e metacetônico	10^2 a 10^6 M	<i>Oreochromis niloticus</i>	Mudanças na atratividade da dieta.	Xie et al. (2003).
Mistura de ácidos e KDF	0,1 a 0,3%	Tilápia híbrida	Aumento da sobrevivência frente a <i>S. agalactiae</i> nos peixes suplementados com 0,2%KDF	Ng et al. (2009).
KDF	0,3 a 1,2%	Tilápia híbrida	A concentração de 0,6% aumentou o ganho de peso e modificou a microbiota intestinal.	Zhou et al. (2009).

Quadro 2 – Continuação.

Ácido cítrico	3%	<i>Labeo rohita</i>	Aumento da disponibilidade de minerais.	Baruah et al. (2005, 2007).
Ácido cítrico	1 e 3%	<i>Pagrus major</i>	Melhora do ganho de peso, conversão e retenção de N e P.	Sarker et al. (2005); Hossain et al. (2007).
Ácido cítrico	2 e 3%	<i>Huso huso</i>	Aumento da retenção de Ca e P.	Khajepour e Hosseini (2012a).
Ácido cítrico	3%	<i>H. huso</i>	Aumento de ganho de peso e melhoria de conversão e digestibilidade.	Khajepour e Hosseini (2012b).
Ácido cítrico	0,5 e 1%	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Melhoria da retenção de P.	Sarker et al. (2012a, 2012b).
Ácido acético + fórmico; ácido benzóico+sórbi co; benzoato + sorbato	1%	<i>Haliotis midae</i>	Aumento do ganho de peso e comprimento.	Goosen et al. (2011).
Fórmico, acético, propiónico, butírico e valérico	20mM na água	<i>Artemia franciscana</i>	Aumento da sobrevivência frente à <i>Vibrio campbellii</i> .	Defoirdt et al. (2006).
PHB	100mM na água	<i>A.franciscana</i>	Aumento da sobrevivência frente à <i>Vibrio campbellii</i> .	Defoirdt et al. (2007).

Quadro 2 – Continuação.

PHB	100mg/L + Probiótico	<i>A. franciscana</i>	Aumento da sobrevivência frente à <i>Vibrio campbellii</i> .	Liu et al. (2010).
PHB	Via artêmia	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Melhora da sobrevivência e desenvolvimento larval, e diminuição de bactérias totais e de <i>Vibrio</i> sp. nas larvas.	Nhan et al. 2010.
Citrato de sódio	0,5%	<i>Marsurpenaeus japonicus</i>	Aumento do crescimento.	Lückstädt (2008).
Formiato de cálcio	0,25%	<i>Penaeus monodon</i>	Aumento da sobrevivência.	Lückstädt (2008).
Acetato, butirato, citrato, formiato, propionato, lactato	2%	<i>L. vannamei</i>	Mudanças na atratividade, consumo e digestibilidade.	Silva et al. (2013).

Os primeiros estudos com a suplementação de sais orgânicos na dieta de animais aquáticos foi publicado nos anos 90, mostrando resultados promissores em salmão (*Salvelinus alpinus*). Ringo (1991) e Ringo; Olsen e Castell (1994) observaram que a adição de 1% de lactato na alimentação do salmão aumentou o crescimento e a eficiência alimentar, diminuiu a ocorrência de diarreia durante o cultivo e não alterou a qualidade da carne do filé.

Além da melhoria nos parâmetros zootécnicos, nos últimos anos diversos artigos relatam também a maior disponibilidade de minerais com o uso dos ácidos orgânicos. A adição de ácido fórmico na dieta (0,4 e 1%) para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) reduziu o pH intestinal e aumentou a digestibilidade aparente dos minerais fósforo (P), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) (VIELMA; LALL, 1997). Para carpa rohu (*Labeo rohita*), que é um peixe agástrico, a suplementação com ácido cítrico (3%) resultou em aumento da disponibilidade de minerais na dieta e consequentemente aumentou a mineralização óssea, principalmente nas dietas com níveis de proteínas abaixo da exigência para esta espécie (BARUAH et al., 2005, 2007).

Estudos com o pargo vermelho (*Pagrus major*) mostraram que o uso de ácido cítrico nas concentrações de 1% a 3% favorece a melhoria no crescimento dos peixes, a taxa de conversão alimentar e a absorção e retenção de N e P. (SARKER; SATOH; KIRON, 2005; HOSSAIN; PANDEY; SATOH, 2007). Os autores destes estudos relacionam o uso do ácido cítrico com a redução do potencial de poluição ambiental dos resíduos nos cultivos de pargo vermelho, desenvolvendo assim dietas ecologicamente amigáveis.

Já esturjões europeu (*Huso huso*) alimentados com dieta suplementada com 2 e 3% de ácido cítrico apresentaram maiores retenções no músculo de Ca e P, que foi atribuído pelos autores a dois fatores: (1) o efeito da redução de pH da dieta havendo maior solubilização destes compostos, e (2) o efeito da quelação do Ca e P pelo ácido cítrico (KHAJEPOUR; HOSSEINI, 2012a). Olhete (*Seriola quinqueradiata*) alimentado com dietas suplementadas com 0,5% e 1% de ácido cítrico também apresentaram aumento na retenção de P (SARKER et al., 2012a, 2012b).

Trutas arco-íris alimentadas com dieta suplementada com 1% de diformiato de sódio (NaDF) apresentaram aumento na digestibilidade de lipídeos, cinzas e proteínas, além de todos os aminoácidos essenciais e não essenciais com exceção da fenilalanina. Além disso, o NaDF também aumentou a estabilidade da ração (MORKEN et al., 2011).

Contudo, a suplementação de 1,2 % de KDF não alterou a digestibilidade da dieta para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (MORKEN et al. 2012).

Em um estudo com tilápias híbridas (*Oreochromis* sp.) não foi observado diferença no pH da dieta incluindo concentrações de 0,1% a 0,3% de uma mistura de ácidos orgânicos (não especificada) e consequentemente os autores não observaram diferença nos parâmetros zootécnicos e na digestibilidade aparente de proteína, lipídeo e fósforo (NG et al., 2009). Assim como Gao et al. (2011), que não observaram alterações no crescimento e na digestibilidade de macronutrientes e aminoácidos da truta arco-íris alimentadas com dieta suplementada com uma mistura de 1% de formiato e butirato de sódio.

Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dieta suplementada com 0,5% de ácido algínico (polissacarídeo que possui grupos carboxílicos) também não apresentaram mudanças nos parâmetros zootécnicos nem na microbiota bacteriana e morfologia intestinal (MERRIFIELD et al., 2011). Já a tilápia híbrida (*Oreochromis* sp.) alimentada com dieta suplementada com 0,6% de KDF apresentou aumento do ganho de peso e alteração da microbiota intestinal (ZHOU et al., 2009). O uso de dieta suplementada com 0,6% de uma mistura de ácidos propiônico e fórmico resultou em alterações na microbiota intestinal em trutas arco-íris (JAAFARD et al., 2013).

Os ácidos orgânicos também podem alterar a atratividade das deitas. Xie; Zhang e Wang (2003) observaram efeitos atrativos para tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas suplementadas com ácidos cítrico e láctico, enquanto o ácido acético e metacetônico tiveram efeitos repulsivos.

Os ácidos orgânicos também podem interferir na saúde animal, sendo uma alternativa importante para substituição de quimioterápicos (DEFOIRT et al., 2011). Alguns estudos relatam o aumento da sobrevivência de animais aquáticos suplementados com ácidos orgânicos e desafiados com bactérias patogênicas. Estudos com tilápias híbridas (*Oreochromis* sp.) suplementadas com 0,1% de KDF demonstraram uma diminuição na taxa de mortalidade das tilápias, após desafio com *Streptococcus agalactiae*, de 58,3% para 16,6% (NG et al., 2009).

Estudos com artêmias (*Artemia franciscana*) demonstraram que a utilização de 20 mM dos ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico e valérico na água de cultivo das artêmias aumentaram a sobrevivência após desafio com *Vibrio campbellii* (DEFOIRDT et al., 2006).

Mudanças metabólicas também podem ser observadas com a utilização de ácidos orgânicos ou seus sais como aditivos alimentares. Estudo com dourada (*Sparus aurata*) alimentada com dieta suplementada com 0,3% de butirato de sódio, protegido com óleo de dendê, apresentou aumento de vários metabólitos no intestino, como nucleotídeos e derivados, aminoácidos essenciais e intermediários da glicólise, além do aumento no ganho de peso dos animais (ROBLES et al., 2013).

Porém, a grande desvantagem do uso dos ácidos orgânicos ou seus sais na aquicultura é que eles possuem alta solubilidade em água, havendo grande lixiviação na ração, necessitando assim de grandes quantidades para manter sua eficiência (DEFOIRDT; SORGELOOS; BOSSIER, 2011). Com isso, surgem trabalhos testando os polímeros polihidroxialconatos, sendo o polihidroxibutirato (PHB, polímero biodegradáveis de ácido butírico) o mais comumente estudado. Curiosamente, vários estudos forneceram evidências de que estes polímeros podem ser degradados no trato gastrointestinal dos animais e, com isso, resultar em efeitos de biocontrole semelhantes aos descritos para os ácidos orgânicos (DEFOIRDT et al., 2009).

Schryver et al. (2010) observaram que a adição de 2 e 5% de PHB na dieta de juvenis de robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) aumentou o ganho de peso, melhorou a conversão alimentar, diminuiu o pH do intestino, e alterou a comunidade bacteriana do trato intestinal dos peixes.

Alguns estudos com PHB também relatam seu efeito positivo em crustáceos. Defoirdt et al. (2007) observaram aumento da sobrevivência de artêmias desafiadas com *V. campbellii*, cultivadas com adição de PHB na água. Larvas do *Macrobrachium rosenbergii*, camarão gigante da Malásia, alimentadas com artêmias enriquecidas com PHB e ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) apresentaram melhores resultados de sobrevivência e desenvolvimento larval, além de apresentarem uma menor contagem de bactérias totais e de *Vibrio* spp. (NHAN et al., 2010).

Todavia, é possível aumentar a eficiência da utilização do PHB, fornecendo na dieta bactérias ditas como probióticas que possuem alto potencial de degradação desta molécula. Com este intuito foi isolado cepas degradadoras de PHB de três espécies: esturjão siberiano (*Acipenser baerii*), robalo europeu (*D. labrax*) e camarão gigante da Malásia (*M. rosenbergii*). As duas melhores cepas de cada espécie que apresentaram maior potencial de degradação de PHB em testes *in vitro*,

foram selecionadas para testes *in vivo* com artêmia. Quando colocadas em conjunto com PHB às cepas isoladas do robalo europeu e do camarão gigante da Malásia aumentaram a sobrevivência de artêmias desafiados com *V. campbellii* (LIU et al., 2010).

1.4.1 Uso de ácidos orgânicos e seus sais na carcinicultura

Estudos com o uso de ácidos orgânicos no cultivo de camarões marinhos são escassos. Segundo Lückstädt (2008), até este ano havia apenas relatos de dois trabalhos. Tung et al. (2006, apud LÜCKSTÄDTS, 2008) relatou que a adição de 0,5% de citrato de sódio com lactobacilos inativados impulsionou o crescimento do camarão *Masurpenaeus japonicus*. Outro estudo sugere que a dose de 0,25% de formiato de cálcio pode aumentar a sobrevivência do *Penaeus monodon* em fazendas de Taiwan (TAN SEONG LIM, comunicação pessoal 2005, apud LÜCKSTÄDTS, 2008).

Mais dois estudos foram relatados em revistas de divulgação técnica. *Penaeus monodon* alimentado com dieta suplementada com 0,1% de produto comercial composto por 30-40% de butirato de sódio protegido com óleos vegetais, apresentou melhorias na digestibilidade da matéria seca, energia e proteína bruta e, em cultivo, aumentou 9% do ganho de peso e 3% da sobrevivência (NUEZ-ORTIN, 2011). Já juvenis de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dieta suplementada com 0,5% de KDF apresentaram valores superiores de ganho em peso e sobrevivência, apresentando no final uma produtividade de 19,5% maior em relação aos camarões alimentados com dieta não suplementada (KÜHLMANN; JINTASATAPORN; LÜCKSTÄDT, 2011).

Alguns autores através de ensaios *in vitro* já sugeriam que o uso de alguns ácidos orgânicos, como ácido fórmico, acético, propiônico e butírico, inibem o crescimento de vibrios patogênicos para camarões marinhos (MINE; BOOPATHY, 2011; ADAMS; BOOPATHY, 2013).

Silva et al. (2013) observaram o potencial de seis sais de sódio (acetato, butirato, citrato, formiato, l-lactato, propionato) como aditivos alimentares de *L. vannamei* através de ensaios de inibição de patógenos *in vitro*, contagem bacteriológica da microbiota intestinal, atratividade, consumo e digestibilidade das dietas suplementadas com estes sais orgânicos. Os autores relataram boa atividade inibitória de vibrios para acetato, butirato, formiato e propionato. Além disso, o butirato apresentou efeito atrativo na dieta e aumento de consumo, enquanto o propionato apresentou aumento na digestibilidade de fósforo e energia.

Há relatos da suplementação de outros acidificantes em dietas para camarões marinhos. Estudos publicados com a suplementação dietética do alginato de sódio em *L. vannamei* e *P. monodon* relatam, para as duas espécies, que o alginato de sódio apresenta melhorias nos parâmetros imunológicos atuando como imunomodulador, e em alguns casos melhora a sobrevivência frente desafio experimental com *V. alginolyticus* (CHENG *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2006; YEH *et al.*, 2009). No entanto, Cheng *et al.* (2005) não observaram mudanças nos parâmetros zootécnicos na engorda de *L. vannamei* alimentados com dietas suplementadas com 0,05% a 0,2% de alginato de sódio. Anuta *et al.* (2011) verificaram que a adição de até 2% do ácido inorgânico comercial, com base no sulfato de cálcio, não alterou os parâmetros zootécnicos do *L. vannamei*, contudo verificou-se o aumento da resposta imunológica e alteração da microbiota intestinal.

1.5 Cultivo superintensivo em sistema de bioflocos

Com intuito de possuir um sistema com maior biossegurança contra as doenças e aumentar a produtividade, a carcinicultura mundial desenvolveu sistemas de cultivos intensivos ou superintensivos com baixa renovação de água, destacando-se o sistema de cultivo em flocos microbianos (SCHUUR, 2003; PRUDER 2004; AVNIMELECH, 2006; TAW, 2010). Esta produtividade elevada pode ser alcançada trabalhando a relação entre Carbono:Nitrogênio (C:N) dentro dos sistemas de cultivo para manter uma boa formação do floco microbiano (AVNIMELECH, 1999).

Os cultivos superintensivos de camarões em bioflocos são altamente tecnificados, utilizando tanques pequenos (máximo 0,4 ha), alta densidade de cultivo (200-900 camarões/m²), troca zero de água e formação de flocos microbianos em suspensão (WASIELESKY *et al.*, 2006). Por não fazer renovação de água, ter cobertura do fundo dos viveiros com geomembrana e a possibilidade de uso de larvas livres de patógenos específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogenic Free*) este sistema de cultivo é reconhecido por ter maior biosseguridade (MCINTOSH, 2001).

O cultivo neste sistema favorece a formação dos bioflocos microbianos (BRATVOLD, BROWDY, 2001), que são agregados microbianos com uma mistura complexa, compostos por bactérias, algas, fungos, protozoários, rotíferos, nematóides, entre outros. Os bioflocos são constituídos por uma biomassa microbiana, resultante da conversão de detritos orgânicos, sendo consumida regularmente pelos camarões durante o cultivo (CUZON *et al.*, 2004, WASIELESKY *et al.*,

2006). Além de proteína, os flocos contêm quantidades importantes de macronutrientes (cálcio, fósforo, potássio e magnésio) e micronutrientes (cobre, ferro, manganês e zinco), assim como aminoácidos e ácidos graxos (MOSS; FOSTER; TACON, 2006). Esse consumo contribui duplamente para a dinâmica do cultivo, pois além de constituir uma fonte para a nutrição dos camarões é um eficiente instrumento de reciclagem dos nutrientes através da biomassa de animais cultivados (MCINTOSH, 2001).

A manutenção de uma concentração adequada de sólidos no cultivo também é de suma importância para o bem estar do camarão. Ray et al. (2010) relataram que o uso de decantadores no cultivo superintensivo de camarões marinhos diminuiu os sólidos do cultivo e consequentemente melhorou parâmetros de qualidade de água e índices zootécnicos. Schweitzer et al. (2013), após um cultivo de *L. vannamei* em sistema de bioflocos com diferentes níveis de sólidos totais, indicaram a manutenção destes em 400 a 600 mg.L⁻¹. Os autores também observaram que valores muito baixos prejudicavam a nitrificação e consequentemente deterioram a qualidade da água, enquanto valores muito altos (800 a 1000 mg.L⁻¹) aumentavam a presença de partículas nas brânquias, diminuindo a sobrevivência e produtividade do cultivo.

O uso de aditivos alimentares, como os ácidos orgânicos, também podem auxiliar na disponibilidade de nutrientes como o nitrogênio e fósforo, os dois nutrientes das excretas de peixes e camarões que mais impactam negativamente o ambiente de cultivo (PANDEY; SATOH, 2008). Com a diminuição destes nutrientes no sistema de bioflocos, pode haver uma melhora na qualidade da água do cultivo, levando uma melhor condição para os camarões no sistema de bioflocos (AVNIMELECH, 2006).

Ademais, a intensificação da produção proporciona condições para a proliferação de bactérias patogênicas oportunistas, como os vibrios, principais causadores de bacterioses em camarões (MOURIÑO et al., 2008). Além desse fato, a inviabilidade do uso de antibióticos neste sistema de cultivo, pois estes prejudicariam a manutenção dos microrganismos que compõem o bioflocos, torna-se necessário o uso de aditivos alimentares que aumentem a capacidade imunitária dos animais aquáticos e diminuam a carga de bactérias patogênicas (DEFOIRD et al., 2009). Sendo assim, torna-se interessante o uso dos ácidos orgânicos e seus sais com potencial inibitório contracepas de vibrios no trato

intestinal de camarões, podendo proporcionar aumento nas sobrevivências.

2 JUSTIFICATIVA

Durante a última década, uma maior compreensão foi adquirida sobre a importância da microbiota intestinal de animais aquáticos em relação a sua nutrição e saúde. Há evidências de que a complexa ecologia microbiana do intestino fornece benefícios nutricionais e proteção contra patógenos. Devido a este fato, é crescente o número de estudos que avaliam os efeitos de aditivos alimentares com intuito de promover melhorias na digestão de nutrientes, na saúde e no desempenho zootécnico dos animais.

Os estudos realizados até o presente momento indicam que os ácidos orgânicos possuem bom potencial como suplementos alimentares para melhorar principalmente as taxas de desempenho zootécnico, através da melhoria da eficiência alimentar, digestibilidade de nutrientes; alteração da microbiota do intestino e aumento da resistência a doenças das espécies aquáticas. Contudo, estudos com camarões marinhos são praticamente inexistentes, mas necessários para melhor compreender os mecanismos dos potenciais efeitos benéficos destes compostos.

Além disso, na aquicultura intensiva, há a necessidade de melhorar tecnologias de produção, com objetivo de diminuir custos e aumentar a eficiência dos sistemas de produção, através da redução de poluentes. Sendo assim, alguns estudos evidenciam a redução da carga bacteriana específica no trato intestinal de animais alimentados com suplementação de ácidos orgânicos, além da redução da excreção de nitrogênio e fósforo para o ambiente.

O número limitado de informações sobre a influência dos ácidos orgânicos para camarões marinhos proporciona um caráter de ineditismo e importância aos estudos que visam avaliar o uso destes como aditivos alimentares e seu efeito na nutrição e saúde do cultivo de camarões marinhos, *Litopenaeus vannamei*.

3 OBJETIVO

Objetivo Geral

Contribuir para o desenvolvimento da carcinicultura marinha, avaliando o uso de sais orgânicos como aditivos alimentares, no auxílio da nutrição e saúde de *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos específicos

a) Selecionar diferentes sais orgânicos para serem testados em engorda de camarões marinhos através de testes de inibição de patógenos *in vitro* e *in vivo*, atratividade de dietas contendo os sais orgânicos, além da determinação coeficiente de digestibilidade aparente de matéria seca, proteína bruta, energia e fósforo, e estabilidade dos sais na dieta.

b) Comparar o efeito dos dois melhores sais orgânicos selecionados, em diferentes concentrações, nos parâmetros zootécnicos, composição centesimal, retenção de nitrogênio e fósforo e parâmetros hemato-imunológicos na engorda de camarões marinhos em água clara.

c) Comparar o efeito dos dois melhores sais orgânicos selecionados em diferentes concentrações na sobrevivência e nos parâmetros hemato-imunológicos após desafio experimental com *Vibrio* sp., de camarões marinhos cultivados em água clara.

d) Avaliar o uso do sal orgânico selecionado nas etapas anteriores, sobre os parâmetros zootécnicos, parâmetros de qualidade de água, composição centesimal, retenção de nitrogênio e fósforo, e parâmetros hemato-imunológicos na engorda de camarões marinhos em sistema intensivo de bioflocos.

e) Avaliar o uso do sal orgânico selecionado nas etapas anteriores sobre a sobrevivência e os parâmetros hemato-imunológicos após desafios experimentais com *Vibrio* sp., de camarões marinhos cultivados em sistema intensivo de bioflocos.

4 FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS

A tese está dividida em quatro capítulos. O primeiro referente à introdução e revisão de literatura e os três demais correspondem cada um a um artigo. O segundo, terceiro e quarto capítulos estão formatados de acordo com as normas da revista *Aquaculture* (A2, Fator de impacto: 2,009).

CAPÍTULO II

Seleção de sais de ácidos orgânicos por múltiplos critérios para nutrição de camarões marinhos

Bruno Corrêa da Silva^{1*}, Gabriela Soltes¹, José Luiz Pedreira Mouriño¹,
Felipe do Nascimento Vieira¹, Walter Quadros Seiffert¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos, Servidão dos Coroas 503 (fundos), Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil.
*bcs85@hotmail.com

*Artigo publicado na Aquaculture em 2013, volume 384-387, páginas 104-110.

5 RESUMO

Ácidos orgânicos e seus sais podem ser usados como promotores de crescimento na aquicultura, ajudando na inibição de patógenos no intestino, promovendo energia para os organismos aquáticos, e aumentando a digestibilidade de nutrientes da dieta. O objetivo deste estudo foi selecionar sais de sódio, como formiato, acetato, propionato, lactato, butirato e citrato, com potencial para ser utilizado como aditivo alimentar para camarões marinhos. Foi realizada uma análise de inibição *in vitro* contra três espécies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. alginolyticus*, e *V. anguillarum*), em dois pHs diferentes (6,2 e 7,1). A atratividade das dietas foi analisada pela porcentagem de escolhas positivas e rejeição em aquários de dupla escolha em formato de labirinto em Y. A lixiviação dos diferentes sais nas dietas foi avaliada após imersão em água salgada por 0, 15, 30, 45 e 60 min. Além disso, foi avaliada a alteração na contagem de bactérias intestinais após alimentação dos camarões durante 14 dias com dietas contendo 2% de seus sais e mais uma dieta controle. Posteriormente, foi possível determinar a contagem de bactérias marinhas heterotróficas totais (Agar Marine), vibrios (Agar TCBS) e bactérias ácido lácticas (Agar MRS). Os dados de inibição *in vitro* e *in vivo*, além dos testes de atratividade e lixiviação das dietas, foram utilizados para selecionar os melhores sais orgânicos pela análise de ideótipo através da distância de Mahalanobis. Após esses testes, os três melhores sais foram usados no teste de consumo e digestibilidade de matéria seca, proteína, energia e fósforo. Os resultados deste estudo claramente indicam que os sais orgânicos possuem atividade inibitória contra vibrios patogênicos para camarões marinhos, sendo o propionato, butirato e acetato os sais que apresentaram maior capacidade de inibição ($p < 0,0001$). Quanto à estabilidade dos sais nas dietas, moléculas com maior número de carbonos (C), como butirato (4C), lactato (3C) e citrato (6C), mostraram menor lixiviação. A atratividade e o consumo das dietas comerciais também aumentaram quando suplementadas com propionato e butirato ($p < 0,05$). Além disso, propionato de sódio diminuiu a concentração de vibrios na microbiota intestinal dos camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* ($p < 0,05$), e aumentou a digestibilidade de energia ($p < 0,01$) e fósforo ($p < 0,02$). Com isso podemos concluir que o uso de sais orgânicos pode melhorar a nutrição e saúde de camarões marinhos e que o propionato tem potencial como aditivo alimentar para *L. vannamei*.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, sais de sódio, nutrição, inibição de patógenos.

6 ABSTRACT

Organic acids or their salts can be used as growth promoters in aquaculture, aiding in pathogen inhibition in the intestinal tract, providing energy to aquatic organisms, and improving the digestibility of dietary nutrients. The objective of the present study was to select sodium salts of organic acids such as formate, acetate, propionate, lactate, butyrate and citrate, with potential to be used as feed additives for marine shrimp. *In vitro* inhibition of three *Vibrio* species (*Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, and *V. anguillarum*), was performed at two different pH values (6.2 and 7.1). The attractiveness of the diets was assessed by the percentage of positive choices and rejection, in aquariums of dual choice Y-maze format. The leaching of different salts in the diets was also evaluated after immersion in seawater for 0, 15, 30, 45 and 60 min. In order to evaluate changes in the intestinal bacterial count, shrimps were fed with diets containing 2% of their salts plus a control diet during 14 days. Later, it was possible to determine the bacteriological count of total heterotrophic marine bacteria (Marine Agar) vibrio species (TCBS Agar) and bacteria lactic acid (MRS Agar). Subsequently, bacterial inhibition *in vitro* and *in vivo*, data together with attractability assays and leaching of diets were used to select the best salts by the ideotype test through Mahalanobis distance. After, the top three salts were used in the tests of feed intake and digestibility of dry matter, protein, energy and phosphorus. The results of this study clearly indicate that salts of organic acids possess inhibitory activity against pathogenic vibrio species in marine shrimp, with propionate, butyrate, and acetate salts exhibiting the highest inhibitory capacity ($p < 0.0001$). Regarding the stability of salts in the diets, molecules with a higher carbon number (C), such as butyrate (4C), lactate (3C), and citrate (6C), showed less leaching. There was also increased attractiveness and consumption of commercial diets when they were supplemented with sodium propionate and butyrate ($p < 0.05$). Furthermore, sodium propionate decreased the vibrio species concentration in the intestinal microbiota of marine shrimp ($p < 0.05$), *Litopenaeus vannamei*, besides increasing the apparent digestibility of energy ($p < 0.01$) and phosphorus ($p < 0.02$). Thus, we conclude that the use of salts of organic acids could improve marine shrimp nutrition and health and that the salt propionate has the greatest potential for use as a diet supplement for *L. vannamei*.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; sodium salts; nutrition; pathogen inhibition.

7 INTRODUÇÃO

A partir de janeiro de 2006, o uso de antibióticos na produção animal foi proibido pela União Europeia, sendo esta uma tendência mundial. Isso porque a utilização de antibióticos na alimentação animal induz à transferência de resistência a espécies de bactérias patogênicas para animais e seres humanos (Lückstädts, 2006). Com isso, surge um maior interesse em buscar substâncias alternativas aos antibióticos, que também atuem na inibição de patógenos e como promotores de crescimento (Lim et al., 2010). Neste contexto, o uso de ácidos e sais orgânicos torna-se uma alternativa promissora para ser utilizada como aditivos alimentares para animais aquáticos (Lückstädts, 2008).

No trato intestinal dos animais aquáticos, os ácidos orgânicos inibem o crescimento de bactérias, principalmente as Gram-negativas, penetrando pela parede celular liberando prótons no citoplasma. Com isso, as bactérias consomem uma grande quantidade de ATP para excretar os prótons, tentando manter o equilíbrio do pH intracelular, resultando em uma depleção de energia celular, e posteriormente à morte (Defoirdt et al., 2009).

Os ácidos orgânicos e seus sais também podem contribuir do ponto de vista nutricional, podendo servir como fonte de energia, pois são componentes de diversas rotas metabólicas, por exemplo, para a geração de ATP no ciclo do ácido cítrico ou ciclo dos ácidos carboxílicos (Lehninger et al., 2007). Adicionalmente, os ácidos orgânicos e seus sais podem aumentar a digestibilidade das dietas. Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a suplementação da dieta com 1% de diformiato de sódio (NaDF) incrementou a digestibilidade de nutrientes como proteínas, aminoácidos e lipídeos e da estabilidade da ração (Morken et al., 2011).

Ademais, estudos mostraram que o uso de ácido cítrico, em concentrações de 0,5% a 3%, favorece a retenção de nitrogênio (N) e fósforo (P) no pargo vermelho (*Pagrus major*) (Sarker et al., 2005; Hossain et al., 2007), aumenta a biodisponibilidade de cálcio (Ca) e P para esturjão (*Huso huso*) (Khajepour e Hosseini, 2012), e aumenta a retenção de P do olhete (*Seriola quinqueradiata*) (Sarker et al. 2012a; Sarker et al. 2012b).

Porém, estudos com o uso de ácido ou sais orgânicos no cultivo de camarões marinhos são muito limitados. Lückstädts (2008) relatou a existência de apenas dois trabalhos, não publicados em revistas científicas. No primeiro estudo, a adição de 0,5% de citrato de sódio com lactobacilos inativados proporcionou o maior crescimento do

camarão *Marsurpenaeus japonicus*. Outro estudo sugere que uma dose de 0,25% de formiato de cálcio melhora a sobrevivência do *Penaeus monodon* em fazendas de Taiwan.

Mais dois estudos foram relatados em revistas de divulgação. *Penaeus monodon* alimentado com dieta suplementada com 0,1% de produto comercial composto por butirato de sódio protegido, melhorou a digestibilidade de matéria seca, proteína bruta e energia, ocasionando uma melhora no ganho de peso, sobrevivência e conversão alimentar (Nuez-Ortin, 2011). Já *L. vannamei* alimentado com dieta suplementada com 0,5% de diformiato de potássio (KDF) mostrou um aumento de 19% na produtividade (Kühlmann et al., 2011).

Em revistas científicas, Anuta et al. (2011) verificaram que a adição de até 2% do ácido inorgânico comercial, com base no sulfato de cálcio, não alterou os parâmetros zootécnicos do *L. vannamei*, contudo verificou-se o aumento da resposta imunológica e alteração da microbiota intestinal.

Este estudo foi realizado para selecionar diferentes sais de ácidos orgânicos usados na produção animal, considerando vários efeitos benéficos que esses aditivos podem ter sobre o camarão marinho. Entre os efeitos benéficos potenciais, é possível citar a inibição de patógenos, alteração microbiota intestinal, aumento da atratividade e palatabilidade, melhoria de consumo e digestibilidade das dietas, além de manter-se estável nas dietas de camarões marinhos. Com isso, o objetivo do presente estudo foi selecionar sais orgânicos (formiato, acetato, propionato, lactato, butirato e citrato) com potencial para o uso como aditivo alimentar para o camarão marinho utilizando os critérios citados anteriormente.

8 MATERIAL E MÉTODOS

O preparo das dietas e os experimentos foram realizados no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), as análises de HPLC no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, e as análises de determinação do coeficiente de digestibilidade no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, todos pertencentes à Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.

8.1 Sais orgânicos

Os sais orgânicos (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) utilizados neste estudo foram: formiato de sódio (HCOONa), acetato de sódio (CH₃COONa), propionato de sódio (CH₃CH₂COONa), lactato de

sódio ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COONa}$), butirato de sódio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COONa}$) e citrato de sódio ($\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COOH})_2$).

8.2 Material biológico

Foram utilizados camarões *Litopenaeus vannamei* oriundos da reprodução da segunda geração de uma linhagem livre de patógenos específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*) de notificação obrigatória pela Organização Internacional de Epizootias (WSSV, IHNV, TSV, IMNV e YHV) provenientes da Aquatec Ltda., localizada no Rio Grande do Norte, Brasil cultivados no LCM. Os camarões foram cultivados em sistema intensivo fechado com bioflocos bacterianos até atingirem o peso necessário para realização dos testes.

8.3 Inibições de patógenos bacterianos *in vitro*

A capacidade de inibição dos sais orgânicos *in vitro* contra três cepas de bactérias patogênicas para o camarão marinho (*Vibrio harveyi* ATCC 14126, *V. alginolyticus* BCCM 2068 e *V. anguillarum* ATCC 19264) foram avaliadas pela metodologia de mínima concentração inibitória (MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*), adaptada de CLSI (2006), em dois valores de pH (pH da ração e pH do intestino de *L. vannamei*).

O pH da dieta foi mensurado de acordo com a metodologia descrita por Baruah et al. (2005). Cinco gramas da dieta comercial foram macerados em gral de porcelana e misturados em 50 mL de água deionizada durante 1 min, utilizando um agitador magnético. Após a homogeneização da dieta o pH da solução foi mensurado. A ração comercial utilizada foi a Guabi 35 EXT 2 mm (São Paulo, Brasil) (Tabela 1).

Para mensurar o pH do intestino dos camarões (aproximadamente 10 g), quinze animais foram amostrados em tanques de bioflocos e deixados em jejum durante 24 h em aquários de 61,5 L (35x70x25 cm) com água cristalina, e renovação, para eliminar coprofagia e amostrar o intestino. Posteriormente, cinco camarões foram alimentados uma vez com a dieta comercial com restrição (aproximadamente 1% da biomassa), outros cinco camarões foram alimentados uma vez até a saciedade e outros cinco permaneceram em jejum, objetivando a determinação do pH intestinal em diferentes situações de ingestão alimentar. Após duas horas da alimentação o intestino médio dos camarões foi coletado e o pH mensurado através de um bioeletrodo de pH (Hanna Instruments - Modelo:HI 1083B, USA) (adaptado de Schryver et al., 2010).

Tabela 1 – Composição centesimal da dieta comercial, Guabi 35 EXT (São Paulo, Brasil), e dietas experimentais utilizada nos ensaios.

Fração	Dieta comercial ¹	Controle ²	Acetato ²	Propionato ²	Butirato ²
Umidade (%)	8,2	7,26	7,6	7,2	7,1
Energia (kcal.g ⁻¹)	4414	4396	4440	4396	4424
Proteína Bruta (g.kg ⁻¹)	352,0	338,2	333,8	332,2	340,3
Extrato etéreo (g.kg ⁻¹)	99,8	100,5	99,1	101,3	98,7
Fibras em detergente ácido (g.kg ⁻¹)	27,0	26,1	26,2	24,5	28,1
Cinzas (g.kg ⁻¹)	143,5	141,2	144,9	143,9	145,1
Fósforo (g.kg ⁻¹)	20,2	20,5	19,6	21,0	19,9
Óxido de crômio (g.kg ⁻¹)	-	4,0	4,2	3,8	4,1

¹ Ingredientes da dieta: Farelo de soja, farelo de glúten de milho-60, concentrado proteico de soja, farinha de arroz gelatinizado, farelo de trigo, quirera de arroz, farinha de carne, farinha de vísceras, farinha de peixe, óleo de peixe, fosfato bicálcico, lecitina de soja, melaço, cloreto de sódio, premix vitamínico-mineral, BHT e BHA.

² Dietas utilizadas no teste de digestibilidade.

Para análise do MIC, cada sal orgânico foi diluído a 10% em meio líquido Luria Bertani (LB, 10 g.L⁻¹ de peptona, 5 g.L⁻¹ extrato de levedura e 30 g.L⁻¹ NaCl), e posteriormente estas soluções foram ajustadas para o valor de pH desejado na análise, de acordo com o pH da ração e do intestino, e esterilizadas por filtração em 0,22 µm. Nos testes, foram adicionados 100 µL de LB (ajustado para o pH desejado) a cada poço da microplaca de 96 poços de fundo chato, e 200 µL de cada solução de ácido orgânico adicionado ao primeiro poço da linha. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada fator 2 até o 12^o poço. A cultura de bactérias patogênicas mantidas em meio LB foi semeada a 28 °C por 8 h e preparadas na concentração de 1 x 10³ unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro, de acordo com a

curva de crescimento (Absorbância X Concentração de células) feita anteriormente para cada cepa, sendo adicionados 20 µL destas suspensões em todos os poços. Para os controles foi utilizado somente LB, sem adição dos sais orgânicos, adicionando-se ou não a bactéria patogênica (controle positivo e negativo, respectivamente). As microplacas foram incubadas a 28 °C por 12 h e o crescimento dos microrganismos determinado em leitora de microplaca (ASYS Expert Plus, UK) DO_{595nm}. A mínima concentração inibitória foi recíproca da última diluição do sal orgânico onde houve inibição total. Todos os testes foram realizados em triplicata.

8.4 Preparo das dietas experimentais

A dieta comercial Guabi 35 EXT (Tabela 1) foi previamente moída e peneirada (500 µm) para o preparo de sete dietas, seis contendo a adição de 2% de cada sal de ácido orgânico e uma dieta controle sem aditivo alimentar. As amostras foram homogeneizadas em misturador Y por 15 min, com adição de 2% de carboximetilcelulose (CMC, Synth, Brasil), como aglutinante. Depois de homogeneizadas, foram adicionados 40% de água quente e realizado o processo de peletização através de um moedor de carne e secagem por 18 h a 40 °C.

8.5 Testes de atratividade das dietas experimentais

A atratividade das sete dietas foi avaliada segundo a metodologia descrita por Nunes et al. (2006) através do labirinto em Y. Trezentos camarões com peso inicial de $4,2 \pm 0,3$ g e peso final após três semanas $7,36 \pm 1,41$ g, foram mantidos em três tanques de 8.000 L, com cem camarões por tanque. Para estimular a resposta à alimentação, antes da análise, os camarões foram mantidos 24 h em jejum. Para a realização dos testes foi utilizado um aquário de vidro com formato de um labirinto em Y com as seguintes medidas: 1,3 m x 0,3 m x 0,4 m (comprimento x largura x altura). Antes de cada bateria de testes, toda água do aquário era trocada para evitar influência de algum nutriente ou resto de ração que possivelmente poderia estar presente.

Em cada bateria de testes foram comparadas somente duas dietas. Todas as dietas foram testadas contra todas. As duas dietas testadas foram oferecidas separadamente em quantidades idênticas (2 g), colocadas individualmente ao final do perímetro dos braços do labirinto em Y. Antes das avaliações comportamentais, o camarão foi estocado por 10 min na câmara de aclimatação, para permitir a adaptação ao sistema. A duração total de cada teste foi de 7 min, no caso da não detecção do camarão no tempo limite, o espécime de camarão foi

trocado. Os números de escolhas positivas e rejeições foram calculados em porcentagem para realizar uma comparação final para cada dieta.

8.6 Estabilidade dos sais orgânicos na dieta

Para verificação da estabilidade dos sais orgânicos nas dietas de camarões marinhos, estas foram avaliadas quanto a este parâmetro por cinco períodos de tempos diferentes (0, 15, 30, 45, e 60 min), após a imersão em água salgada (33‰ de salinidade) a 26 °C, de cinco gramas de cada amostra em triplicata para cada intervalo de tempo. Após este período, as amostras originais foram secas em liofilizador.

As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 25 mL de água destilada-deionizada, centrifugadas (4000 g por 10 min) e filtradas (0,22 µm) previamente à análise cromatográfica. A identificação e quantificação dos sais de ácidos orgânicos de interesse (fórmico, acético, láctico, propiônico, butírico e cítrico) foram feitas em sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (Shimadzu LC 10AD), equipado com coluna de exclusão iônica Rezex ROA-Ácidos orgânicos (Phenomenex, 8% estireno-divinilbenzeno sulfonado em cross-link, 250 mm x 4 mm, 8 µm Ø), termostatizador (40 °C) e detector UV-visível (210 nm). Amostras (10 µl) foram eluídas utilizando-se ácido sulfúrico 0,5N como fase móvel, em fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. A detecção dos compostos baseou-se no tempo de retenção (min) e co-cromatografia de compostos padrões (Sigma-Aldrich, MO-USA) sob idênticas condições experimentais. Curvas-padrão externas para cada sal de ácido orgânico em estudo foram obtidas para efeito de quantificação dos compostos. Os valores de concentração referem-se à média de três injeções sequenciais por amostra.

8.7 Alterações da contagem bacteriana intestinal

Foram utilizados 168 camarões marinhos (*L. vannamei*) de 9,6 ± 0,2 g, distribuídos em 21 aquários de 61,5 L (35x70x25 cm), obtendo assim as triplicatas para cada dieta, anteriormente descrita. Os animais foram alimentados até a saciedade aparente quatro vezes ao dia. Durante o período experimental monitorou-se diariamente, oxigênio dissolvido, temperatura (YSI, modelo Pro 20, pH (YSI, modelo Professional Plus) e, duas vezes por semana, amônia e nitrato (APHA, 2005). Após 14 dias de alimentação cinco camarões por unidade experimental foram coletados formando um *pool*. Os intestinos dos camarões foram extirpados assepticamente em câmara de fluxo laminar com auxílio de pinças e bisturi, homogeneizados em solução salina estéril a 3% de NaCl em um graal. Em seguida, as amostras foram diluídas serialmente

(1/10), semeadas em meio de cultura Agar Marine (meio não seletivo para bactérias marinhas heterotróficas totais), Agar De Man Rogosa Sharpe (MRS, meio seletivo para bactérias ácido-lácticas) e Agar de Tiosulfato, Citrato, BÍlis e Sacarose (TCBS, meio seletivo para vibrios), e incubadas em estufa a 28 °C. A contagem total de UFC por grama de intestino foi realizada após 24 h da incubação nos meios de cultura Agar Marine e TCBS e 48 h depois no meio Agar MRS.

8.8 Consumo das dietas experimentais

Sessenta camarões de $9,98 \pm 0,16$ g foram distribuídos em 12 aquários de 61,5 L e aclimatados durante uma semana com ração comercial, sem adição dos sais de ácidos orgânicos. Posteriormente, os camarões foram alimentados, em triplicata, com quatro diferentes dietas, uma dieta controle (sem adição dos sais de ácido orgânico) e outras três dietas contendo 2% dos três melhores sais selecionados nas etapas anteriores. As dietas foram preparadas como descrito anteriormente. Os camarões foram alimentados durante duas semanas duas vezes ao dia com aproximadamente 3% da biomassa total do aquário por alimentação. Após 60 min de cada alimentação a sobra de ração era coletada com uma pipeta Pasteur. Posteriormente, as amostras da ração e das sobras eram secas em 105 °C até peso constante. Com isso, foi possível estimar a porcentagem de consumo aparente pelo peso vivo dos camarões para cada dieta experimental.

8.9 Determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente

Para cada uma das quatro dietas experimentais, 150 camarões marinhos juvenis, pesando $11,7 \pm 0,1$ g no início e $15,7 \pm 0,1$ g no final do experimento após cinco semanas, foram mantidos em tanques de 8.000 L com renovação constante, fluxo de água a $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ e temperatura de 29 °C. Os camarões foram alimentados com as dietas preparadas da mesma forma como explicado anteriormente, porém com a adição de 0,4% de óxido de cromo III (Cr_2O_3) (Tabela 1). Após sete dias de aclimação, 24 camarões de cada tratamento, em triplicata, foram transferidos para aquários de 61,5 L onde foram realizadas as coletas de fezes.

Nestes aquários os camarões foram alimentados duas vezes ao dia (9:00 e 14:00 h) até a saciedade aparente por 40 min. Os aquários foram sifonados cinco vezes por dia, sempre antes de cada alimentação, após o tempo de alimentação e ao final do dia. Cada sifonamento renovava cerca de 20 a 50% do volume do aquário, o suficiente para retirada de nutrientes dissolvidos na água e restos de fezes, carapaça, entre outros

materiais. As fezes foram coletadas com auxílio de uma pipeta tipo Pasteur, em intervalos de 20 min, até 210 min após o início da alimentação. As fezes coletadas diariamente de cada tratamento foram levemente lavadas com água destilada, para evitar alguma possível contaminação da amostra com os sais da água, e posteriormente centrifugadas a 1800 g por 10 min a 4 °C, retirando o máximo de umidade possível de cada amostra, sendo congeladas a -20 °C (Terrazas-Fierro et al., 2010).

Ao final do experimento, quando coletadas cerca de 80 g de matéria úmida de cada réplica, as amostras foram liofilizadas para posterior análise de proteína bruta, energia, cinzas, fósforo e óxido de crômio.

A análise das dietas e das fezes seguiu a metodologia descrita pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*, 1999). A análise de óxido de crômio seguiu a metodologia descrita por Bremer-Neto et al. (2003). Para a quantificação do óxido de crômio, as amostras das dietas e das fezes (0,1 g) foram digeridas com 3 mL de ácido nítrico e 2 mL de ácido perclórico em balões Kjeldahl a 400 °C por 40 min, até obtenção de uma coloração amarelada. Após diluição de 1 L de água destilada, a absorbância foi lida ($DO_{550\text{ nm}}$) e a concentração de óxido de crômio determinada através da comparação com a dosagem de uma curva padrão.

Para a determinação do coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) de matéria seca foi utilizada a equação (Belal, 2005):

$$\text{CDA \%} = 100 - 100 \times \left(\frac{\% \text{ marcador na dieta}}{\% \text{ marcador nas fezes}} \right)$$

Para as determinações dos CDA de proteína bruta, energia bruta e cinzas foram utilizadas a equação (Nose, 1960):

$$\text{CDA \%} = 100 - 100 \times \left(\frac{\% \text{ marcador na dieta} \times \% \text{ N nas fezes}}{\% \text{ marcador nas fezes} \times \% \text{ N nas dietas}} \right)$$

N - nutrientes (proteína bruta, energia bruta total, fósforo).

8.10 Análises estatísticas

Os dados de inibição *in vitro* e *in vivo*, atratividade e estabilidade dos sais nas dietas foram utilizados para formar um ideótipo (produto ideal), por meio das melhores médias dentre os sais orgânicos avaliados para os caracteres analisados. Em seguida, foram estimadas as distâncias de Mahalanobis (D^2), a partir de dados estandardizados, entre todos os

sais orgânicos trabalhados e o ideótipo (Legendre e Legendre, 1998). Desta forma, os sais orgânicos foram classificados de acordo com o índice de seleção da distância ao ideótipo, ou seja, a distância que apresentaram em relação ao ideótipo, sendo considerados os melhores sais orgânicos os que apresentarem as menores distâncias. Os três melhores foram utilizados para realizar os testes de consumo e determinação do coeficiente de digestibilidade aparente das dietas para camarões marinhos.

Os dados de inibição *in vitro* e *in vivo*, os testes de estabilidade dos sais na ração e os dados dos experimentos de consumo e digestibilidade foram submetidos ao teste de Bartlett para verificar a homocedasticidade. Os dados que não apresentaram variâncias homogêneas foram transformados para $\log_{10}(x+1)$. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância unifatorial e se necessário ao teste de separação de médias de Student–Newman–Keuls (SNK). Os dados de escolhas positivas e rejeição dos testes de atratividade, e as comparações realizadas entre todas as dietas foram submetidos à análise de Qui-Quadrado. Todos os testes estatísticos foram considerados com nível de significância de 5%.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Determinação do pH das dietas e intestinal

O pH da dieta comercial com 35% proteína bruta foi em média de 6,2 (6,18-6,24). O pH do intestino dos camarões alterou em relação à alimentação. Os camarões de jejum apresentaram pH médio de 6,35 (6,2-6,6), já os camarões alimentados foram divididos entre camarões com intestino meio cheio e camarões com intestino estendidos, apresentando pH médio de 6,85 (6,71-6,99) e 7,05 (6,9-7,18), respectivamente. Com isso, foram utilizados para as análises de inibição *in vitro* os valores de pH de 6,2 (referente ao pH da ração) e 7,1 (referente ao valor de pH do intestino estendido).

Pouco se conhece sobre o pH do sistema digestível de peneídeos, porém sabe-se que as principais enzimas atuantes são as tripsinas e

quimotripsinas (Hernandez e Murueta, 2009), que são enzimas que atuam em meio alcalino.

9.2 Inibição de patógeno bacterianos *in vitro*

De modo geral, tanto no pH 6,2 quanto no 7,1, os melhores resultados de inibição *in vitro* contra as três espécies de vibrios utilizadas foram obtidos pelo acetato de sódio, butirato de sódio e propionato de sódio. Porém, a eficiência de inibição dos sais orgânicos variou de acordo com o pH, sendo mais eficaz em pH mais baixos (Tabela 2). Isto é explicado pelo fato que o ácido orgânico só é eficaz quando penetra na parede da célula das bactérias Gram-negativas na forma não ionizada, liberando assim os prótons no citoplasma, desestabilizando o pH intracelular da bactéria, levando à morte. Quanto menor o pH maior a concentração no meio da forma não ionizada em relação à forma ionizada do ácido orgânico, aumentando assim a eficiência dos ácidos orgânicos (Defoidt et al., 2009).

Tabela 2 – Análise da mínima concentração inibitória (MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*) (%) dos sais orgânicos frente a patógenos de camarões marinhos com valores de pH de 6,2 e 7,1.

	VA pH6,2	VA pH7,1	VAL pH6,2	VAL pH7,1	VH pH6,2	VH pH7,1
Formiato	0,52±0,18 ^c	2,50±0,00 ^c	0,63±0,00 ^c	2,08±0,72 ^c	0,42±0,18 ^c	1,25±0,00 ^c
Acetato	0,16±0,00 ^d	1,25±0,00 ^d	0,21±0,09 ^c	1,25±0,00 ^d	0,13±0,05 ^c	0,83±0,36 ^c
Propionato	0,10±0,05 ^d	0,63±0,00 ^e	0,13±0,05 ^c	0,52±0,18 ^e	0,13±0,05 ^c	0,42±0,18 ^c
Lactato	5,00±0,00 ^a	10,00±0,00 ^a	4,17±1,44 ^a	10,00±0,00 ^a	5,00±0,00 ^a	10,00±0,00 ^a
Butirato	0,13±0,05 ^d	1,25±0,00 ^d	0,16±0,00 ^c	0,31±0,00 ^e	0,16±0,00 ^c	0,83±0,36 ^c
Citrato	1,25±0,00 ^b	5,00±0,00 ^b	1,25±0,00 ^b	5,00±0,00 ^b	2,08±0,72 ^b	4,17±1,44 ^b
Valor-p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Dados expressos em média ± desvio padrão. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%. VA - *V. anguillarum* ATCC 19264, VAL - *V. alginolyticus* BCCM 2068, VH - *Vibrio harveyi* ATCC 14126.

No entanto, o equilíbrio entre as formas de o ácido orgânico dissociado e não dissociado irá variar de acordo com o valor de pKa de cada ácido orgânico (Lehninger et al, 2007). Este resultado também foi verificado por Defoidt et al. (2006), onde o ácido valérico apresentou maior eficiência em valores mais baixos de pH (5 e 6). Neste estudo também foi possível verificar que houve inibição do *Vibrio campbellii* expostos aos ácidos acético, butírico, propiônico, fórmico e valérico.

9.3 Testes de atratividade das dietas experimentais

Os sais orgânicos foram comparados pelo teste não paramétrico de qui-quadrado, pelos testes comparativos um a um, e pelas porcentagens totais de escolhas positivas e rejeição. Nas comparações um a um, a dieta suplementada com acetato teve efeito repulsivo em relação ao controle, enquanto a dieta com butirato teve efeito atrativo. As dietas suplementadas com butirato também apresentaram maior atratividade em relação às dietas com lactato e formiato (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência de escolhas positivas (%) dos camarões *Litopenaeus vannamei* mantidos no labirinto em Y alimentados com dietas suplementadas com 2% de sais orgânicos.

	Controle	Formiato	Acetato	Propionato	Lactato	Butirato	Citrato
Controle	-	60(5)	25(8)*	40(5)	60(5)	80(5)*	60(5)
Formiato	40(5)	-	53,3(15)	46,6(15)	26,6(15)*	73,3(15)*	40(15)
Acetato	75(8)*	46,6(15)	-	73,3(15)*	60(15)	66,6(15)	60(15)
Propionato	60(5)	53,3(15)	26,6(15)*	-	46,6(15)	40(15)	46,6(15)
Lactato	40(5)	73,3(15)*	40(15)	53,3(15)	-	80(15)*	46,6(15)
Butirato	20(5)*	26,6(15)*	33,3(15)*	60(15)	20(15)*	-	53,3(15)
Citrato	40(5)	60(15)	40(15)	53,3(15)	53,3(15)	46,6(15)	-

*Diferença no teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$). Dados entre parênteses indicam o número de comparações realizadas.

Comparando as porcentagens totais de escolhas positivas das diferentes dietas, não houve diferença significativa ($p=0,13$). Já para porcentagem de rejeição foi maior nas dietas com acetato e formiato em relação às demais ($p<0,0001$) (Tabela 4).

Para maioria dos animais marinhos, os principais atrativos de dietas para o comportamento animal são substâncias de baixo peso molecular, como aminoácidos, nucleotídeos e ácidos orgânicos (Carr & Derby, 1986). Assim como neste estudo, os ácidos orgânicos alteraram a atratividade de dietas para tilápias (*Oreochromis niloticus*), enquanto o ácido cítrico e láctico tiveram efeitos atrativos, o ácido acético e metacetônico tiveram efeitos repulsivos (Xie et al., 2003).

Tabela 4 - Número de comparações e porcentagens (%) de escolhas positivas e rejeições dos camarões *Litopenaeus vannamei* mantidos no labirinto em Y alimentados com dietas suplementadas com 2% de sais orgânicos.

Dietas	Nº testes	Nº Escolha	Nº Rejeição	% Escolha	% Rejeição
Controle	33	15	1	48,48	6,25 ^b
Formiato	80	27	14	51,25	34,15 ^a
Acetato	84	15	16	36,90	51,61 ^a
Propionato	80	41	5	57,5	10,87 ^b
Lactato	80	29	5	42,5	14,71 ^b
Butirato	80	51	0	62,96	0,00 ^b
Citrato	80	36	4	50,00	10,00 ^b
Qui-Quadrado				$p = 0,1373$	$p < 0,0001$

9.4 Estabilidade dos sais orgânicos nas dietas

O número de moléculas de carbono (C) e a polaridade das moléculas influenciam na solubilidade destes. Neste estudo, houve uma tendência das moléculas com mais carbonos apresentarem menor lixiviação na dieta, como por exemplo o butirato (4 C), lactato (3 C) e citrato (6 C). Apesar deste fato, o propionato, com 3 C apresentou maiores lixiviações da dieta, assim como o acetato (2 C) e o formiato (1 C) (Figura 3). As quantidades de lixiviação neste estudo foram altas, chegando alguns sais, como o acetato, a 100% de lixiviação em apenas 30 min. Contudo estas dietas foram peletizadas em moedor de carne, que não consegue atingir níveis altos de gelatinização do amido da dieta, fazendo com que esta fique com baixa estabilidade. No entanto, em

nível de comparação foi possível observar diferença entre os sais orgânicos. Ademais, os sais orgânicos podem melhorar a extrusão da ração, aumentar sua estabilidade e diminuir a expansão do pelete (Morken et al., 2012).

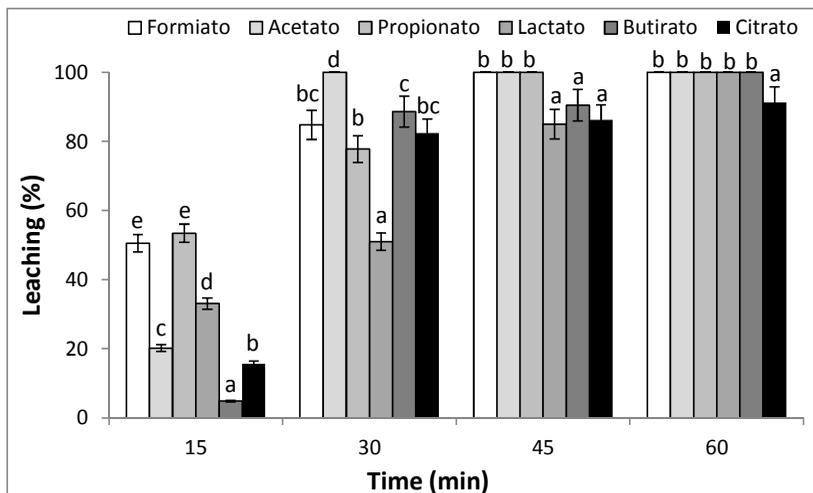


Figura 3 – Porcentagem de lixiviação (%), em diferentes tempos, dos sais orgânicos em dieta comercial para camarões marinhos. Média \pm desvio padrão. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%.

9.5 Alteração da contagem bacteriana intestinal

Neste experimento os parâmetros de qualidade de água foram: oxigênio dissolvido $4,06 - 5,98 \text{ mg.L}^{-1}$, temperatura $27,3 - 28,4 \text{ }^\circ\text{C}$, salinidade $34,8 - 35,1 \text{ ppt}$, pH $7,48 - 7,81$, amônia total $0,09 - 0,35 \text{ mg.L}^{-1}$ e nitrito $0,00 - 0,03 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo os parâmetros homogêneos entre os tratamentos ao longo do tempo.

A contagem de bactérias heterotróficas totais (Agar Marine) foi menor no intestino dos camarões alimentados com dieta suplementada com formiato ($4,8 \pm 4,2 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$), em relação ao intestino dos camarões dos demais tratamentos ($0,28 - 4,5 \times 10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$). Porém, quanto à contagem de vibrios (Agar TCBS) os camarões alimentados com as dietas suplementadas com propionato e lactato ($1,0 \pm 0,47 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ e $2,28 \pm 3,59 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$, respectivamente) apresentaram menores concentrações em relação à contagem do intestino dos camarões do controle ($4,27 \pm 0,63 \times 10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$), não diferenciando dos demais tratamentos. Já a contagem de bactérias ácido

láticas não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($3,4$ a $0,28 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹) (Figura 4).

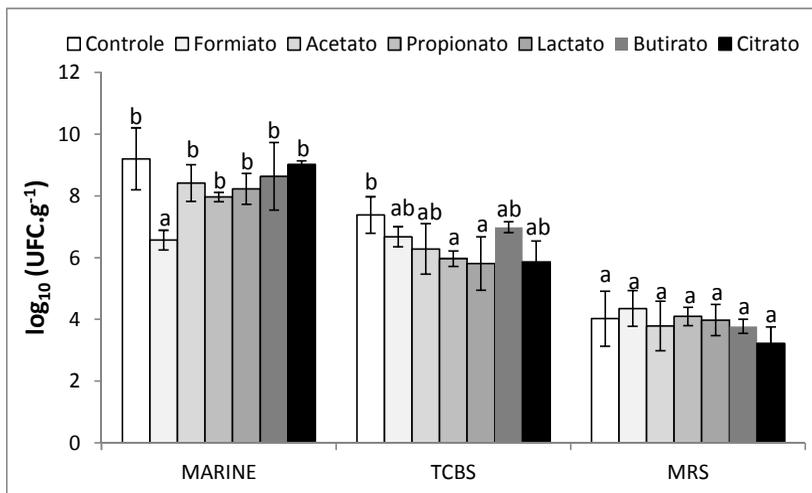


Figura 4 – Análise da contagem bacteriana intestinal de camarões marinhos alimentados com dietas suplementadas com 2% de diferentes sais orgânicos. Média \pm desvio padrão. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%.

Tilápias híbridas (*Oreochromis* sp.) alimentadas com dietas suplementadas com uma mistura de ácidos orgânicos (não informada pelos autores) tiveram reduzidas as contagens de bactérias totais no intestino (Ng et al., 2009). Robalos europeu (*Dicentrarchus labrax*) alimentados com dietas suplementadas de 2 a 10% de polihidroxibutirato (PHB) também apresentaram alteração na microbiota intestinal (Schryver et al., 2010), assim como, *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas suplementadas de 0,4 a 2% Vitoxal, ácido inorgânico comercial a base de sulfato de cálcio (Anuta et al., 2011).

9.6 Seleção dos sais orgânicos

Considerando todos os caracteres avaliados anteriormente, os sais com menor distância ao ideótipo foram o propionato, butirato e acetato, respectivamente (Tabela 5). O índice de seleção da distância ao ideótipo mostrou-se uma importante ferramenta estatística para escolha de aditivos alimentares para animais aquáticos cultiváveis, possibilitando a inclusão de diversas características desejadas na ação deste aditivo em uma mesma análise, selecionando assim o produto que apresenta maior

semelhança com o que é considerado ideal. Esta técnica também já foi utilizada com sucesso na seleção de cepas probióticas para camarões marinhos, onde foram consideradas diversas características desejadas para uma bactéria probiótica; como alta velocidade de crescimento, capacidade de inibição de patógenos, resistência a sais biliares e crescimento a diferentes valores de pH e salinidade; obtendo-se assim uma cepa adequada as condições do animal e do cultivo (Vieira, 2010).

Tabela 5 – Índice de seleção da distância ao ideótipo (IDI) dos sais orgânicos utilizados como aditivos alimentares para o camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*.

Dietas	Distância de Mahalanobis (D ²)
Propionato	19074
Butirato	268696
Acetato	270091
Formiato	2164022
Citrato	10977389
Lactato	55010991

9.7 Consumo e determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente

Nas análises de consumo, as dietas suplementadas com 2% de butirato e propionato apresentaram maior consumo por peso vivo em relação à dieta controle ($p=0,021$), enquanto a dieta suplementada com 2% de acetato não diferiu dos demais tratamentos (Tabela 4). Pargos vermelho (*P. major*) e olhete (*Seriola quinqueradiata*) alimentados com dietas suplementadas com diferentes ácidos orgânicos não apresentaram diferenças no consumo durante a engorda (Sarker et al., 2005; Hossain et al., 2007; Sarker et al., 2012a), assim como o abalone (*Haliotis midae*) alimentado com dieta suplementada com 2% de três misturas diferentes de ácidos orgânicos (Goosen et al., 2011). Já tilápias alimentadas com dietas suplementadas com o diformiato de potássio (KDF) apresentaram aumento no consumo de ração (Ramli et al., 2005).

Quanto à determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente, a dieta suplementada com 2% de propionato de sódio apresentou maior digestibilidade de energia ($p=0,009$) e fósforo ($p=0,011$) em relação às demais dietas. Já para a digestibilidade da proteína bruta e matéria seca não resultou em diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 6). Estudos com ácidos orgânicos relatam a ação destes no aumento da disponibilização e digestibilidade

de minerais, podendo reduzir a excreção de fósforo, diminuindo a carga de resíduos de efluentes da aquicultura, pois junto com o nitrogênio, o fósforo é o nutriente das excretas de peixes e camarões que mais impactam negativamente o ambiente (Pandey e Satoh, 2008).

Tabela 6 – Porcentagem de consumo diário (%) e coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) do camarão marinho, *Litopenaeus vannamei* alimentado com dieta comercial suplementadas com 2% de sais orgânicos.

Tratamento	Consumo (%)	CDA Matéria Seca (%)	CDA Proteína Bruta (%)	CDA Energia (%)	CDA Fósforo (%)
Controle	2,8±1,1 ^b	57,13±3,85	71,72±2,64	73,55±2,05 ^b	12,36±1,61 ^b
Acetato	3,8±1,0 ^{ab}	57,62±1,16	71,93±1,03	73,93±1,03 ^b	9,93±3,61 ^b
Propionato	4,3±0,5 ^a	61,03±3,48	72,91±2,55	79,50±2,26 ^a	20,91±4,38 ^a
Butirato	4,0±1,0 ^a	58,93±2,50	72,95±1,09	73,82±1,60 ^b	12,49±1,78 ^b

Dados expressos em média ± desvio padrão. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%.

Tilápias vermelha híbridas alimentadas com dietas suplementadas com KDF ou uma mistura de ácidos orgânicos não apresentaram diferença significativa nos coeficientes de digestibilidade aparente de matéria seca, proteína, lipídeos e fósforo (Ng et al., 2009). Já esturjões (*Huso huso*) alimentados com dietas suplementadas com 3% de ácido cítrico apresentaram aumento na digestibilidade da proteína e do fósforo (Khajepour e Hosseini, 2012). Para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), a suplementação de 1,2% de KDF não alterou a digestibilidade dos nutrientes (Morken et al., 2012). Porém, para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a suplementação de 1% de formiato de

sódio (NaDF) aumentou a digestibilidade de lipídeos, cinzas e proteínas, além de todos os aminoácidos essenciais e não essenciais, com exceção da fenilalanina (Morken et al., 2011).

10 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível verificar que os sais orgânicos possuem boa atividade inibitória contra vibrios patogênicos para camarões marinhos. Além disso, a utilização de butirato e propionato de sódio a 2% nas dietas comerciais aumentou a atratividade e o consumo das dietas. O propionato de sódio também diminuiu a concentração de vibrios na microbiota intestinal dos camarões marinhos, *Litopenaeus vannamei*, além de aumentar o coeficiente de digestibilidade aparente de energia e fósforo das dietas. Sendo assim, entre os sais orgânicos avaliados, o propionato apresenta maior potencial para ser utilizado na suplementação da dieta de *L. vannamei*. Contudo, mais estudos devem ser realizados para avaliar os parâmetros zootécnicos sobre diferentes concentrações destes sais.

11 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio ao projeto “Bases Nutricionais para o Desenvolvimento de Dietas voltadas para o Cultivo do Camarão *Litopenaeus vannamei* em Regime Intensivo com Flocos Microbianos e Troca Mínima de Água –FINEP/RECARCINA - 2010-2012”. Também gostaríamos de agradecer o apoio do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LABNUTRI-UFSC) e a sua coordenadora Dr. Débora M. Fracalossi, e ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal e ao seu coordenador Dr. Marcelo Maraschin. Finalmente gostaríamos de agradecer também o apoio técnico de Adriano Machado da Silva, Douglas Severino, Douglas Ribeiro, Karine Oliveira e Scheila A. Pereira.

12 REFERÊNCIAS

Anuta, D.J., Buentello, A., Patnaik, S., Lawrence, A.L., Mustafa, A., Hume, M., Gatlin III, D.M., Kemp, M.C., 2011. Effect of Dietary Supplementation of Acidic Calcium Sulfate (Vitoxal) on Growth,

Survival, Immune Response and Gut Microbiota of the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 42, 834-844.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists, 1999. Official Methods of Analyses. 16th ed., Arlington, VA.

APHA, AWWA. "WEF, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association." Inc., Baltimore, MD USA.

Baruah, K., Paul, A.K., Sahu, N.P., Jain K.K., Mukherjee, S.C., Debnath, D, 2005. Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. Aquac. Res. 36, 803 – 812.

Belal, I. E. H., 2005. A review of some fish nutrition methodologies. Bioresource Technol. 96, 395-402.

Bremer-Neto, H., Graner, C.A.F., Pezzato, L.E., Padovani, C.R., Cantelmo, O.A., 2003. Diminuição do teor de óxido de cromo (III) usado como marcador externo. R. Bras. Zootec. 32, 249-255.

Carr, W.E.S., Derby, C.D., 1986. Chemically stimulated feeding behavior in marine animals: Importance of chemical mixtures and involvement of mixture interactions. J. Chem. Ecol. 12(5), 989-1011.

CLSI, 2006. Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guideline M49-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.

Defoirdt, T., Halet, D., Sorgeloos, P., Bossier, P., Verstraete, W., 2006. Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. Aquaculture. 261, 804–808.

Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., 2009. Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. Biotechnol. Adv. 27, 680 – 685.

Goosen, N. J., Görgens, J. F., De Wet, L. F., Chenia, H., 2011. Organic acids as potential growth promoters in the South African abalone *Haliotis midae*. Aquaculture, 321(3), 245-251.

Hernandez, J.C.S., Murueta, J.H.C., 2009. Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 290, 190–195.

- Hossain, M.A., Pandey, A., Satoh, S., 2007. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sci.* 73, 1309 – 1317.
- Khajepour, F., Hosseini, S.A, 2012. Calcium and phosphorus status in juvenile beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. *Aquac.Res.* 43(3), 407–411.
- Kühlmann, K.J., Jintasataporn, O., Lückstädt, C., 2011. Dietary potassium-diformate (KDF) improves growth performance of white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* under controlled conditions. *International Aquafeed*, March-April, 19-22.
- Legendre, P., Legendre, L., 2003. *Numerical ecology*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.A., Cox, M.M., 2007. *Principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers, 1232p.
- Lim, C., Lückstädt, C., Klesius, P.H., 2010. Review: Use of organic acids, salts in fish diets. *Glob. Aquacult. Advocate*. 5, 45 - 46.
- Lückstädt, C., 2006. Acidifiers in aquaculture prove beneficial. *Feed Mix*. 14 (3), 11-12.
- Lückstädt, C., 2008. The use of acidifiers in fish nutrition. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. Nutr. and Nat. Resour.* 3 (044), 1–8.
- Morken, T., Kraugerud, O.F., Barrows, F.T., Sørensen, M., Storebakken, T., Øverland, M., 2011. Sodium diformate and extrusion temperature affects nutrient digestibility and physical quality of diets with fish meal and barley protein concentrate for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 317 (1-4), 138-145.
- Morken, T., Kraugerud, O.F., Sørensen, M., Storebakken, T., Hillestad, M., Christiansen, R., Øverland, M., 2012. Effects of feed processing conditions and acid salts on nutrient digestibility and physical quality of soy-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquacult. Nutr.* 18, 21-34.
- Ng, W-K., Chik-Boon K., Kumar, S., Siti-Zahrah, A., 2009. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and subsequent survival during a

- challenge test with *Streptococcus agalactiae*. Aquac. Res. 40, 1490 – 1500.
- Nose, T., 1960. On the digestion of food protein by goldfish (*Carassius auratus*, L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* G.). Bull Freshw Fisheries Res Lab. 10, 11-22.
- Nuez-Ortin, W.G., 2011. Gustor-Aqua: An effective solution to optimize health status and nutrient utilization. International Aquafeed May-June, 18-20.
- Nunes, A., Sá, M.V.C., Andriola-Neto, F.F., Lemos, D. 2006. Behavioral response to selected feed attractants and stimulants in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 260, 244 – 254.
- Pandey, A., Satoh, S., 2008. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fisheries Sci. 74, 867 – 874.
- Ramli, N., Heindl, U., Sunanto, S., 2005. Effect of potassium-diformate on growth performance of tilapia challenged with *Vibrio anguillarum*. Abstract CD-Rom World Aquaculture Society, Bali, Indonésia; p.9-13.
- Sarker, S.A., Satoh, S., Kiron, V., 2005. Supplementation of citric acid and amino acid-chelated trace element to develop environment-friendly feed for red sea bream, *Pagrus major*. Aquaculture. 248, 3– 11.
- Sarker, M.S.A., Satoh, S., Kamata, K., Haga, Y., Yamamoto, Y., 2012a. Partial replacement of fish meal with plant protein sources using organic acids to practical diets for juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Aquacult. Nutr. 18(1), 81-89.
- Sarker, M.S.A., Satoh, S., Kamata, K., Haga, Y., Yamamoto, Y., 2012b. Supplementation effect(s) of organic acids and/or lipid to plant protein-based diets on juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck et Schlegel 1845, growth and, nitrogen and phosphorus excretion. Aquac. Res. 43, 538–545.
- Schryver, P., Sinha, A.K., Kunwar, P.S., Baruah, K., Verstraete, W., Boon, N., Boeck, G., Bossier, P., 2010. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 1535 – 1541.

Terrazas-Fierro, M., Civera-Cerecedo, R., Ibarra-Martínez, L., Goytortúa-Bores, E., Herrera-Andrade, M., Reyes-Becerra, A., 2010. Apparent digestibility of dry matter, protein, and essential amino acid in marine feedstuffs for juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 308, 166–73.

Vieira, Felipe do Nascimento. Seleção e utilização de bactérias probióticas na carcinicultura marinha. 133 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2010.

Xie, B.S., Zhang, L., Wang, D., 2003. Effects of several organic acids on the feeding behavior of *Tilapia nilotica*. *J. Appl. Ichthyol.* 19, 255 – 257.

CAPÍTULO III

Butirato e Propionato melhoram desempenho zootécnico de *Litopenaeus vannamei*

Bruno Corrêa da Silva^{1,2,*}, Felipe do Nascimento Vieira¹, José Luiz Pedreira Mouriño¹, Norha Bolívar¹, Walter Quadros Seiffert¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos. Servidão dos Coroas 503 (fundos), Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil. ² Bolsista Capes (PDSE 3892-13-1). *bcs85@hotmail.com

*Artigo formatado de acordo com as normas da revista “Aquaculture” (A2, Fator de impacto: 2,009).

13 RESUMO

Os sais orgânicos podem promover a melhoria na eficiência da utilização de nutrientes, além da alteração da microbiota intestinal e aumento da resistência a enfermidades em camarões marinhos. Este estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de propionato de sódio e butirato de sódio em diferentes níveis de inclusões dietéticas na engorda de *Litopenaeus vannamei*. Ao total foram avaliadas sete dietas: uma dieta controle (sem suplementação) e três dietas de cada sal de sódio, propionato e butirato, nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%. Os tratamentos foram avaliados em triplicata, totalizando 21 unidades experimentais de 6.000 L, povoadas com 150 camarões de $2,53 \pm 0,03$ g. Após 47 dias de cultivo, foram avaliados o desempenho zootécnico, retenção corporal de nitrogênio e fósforo, parâmetros hemato-imunológicos, alterações na comunidade microbiana intestinal e sobrevivência após desafio experimental com *Vibrio* sp. patogênico para camarões marinhos. Os camarões alimentados com as dietas suplementadas com o propionato e o butirato aumentaram o peso final e o ganho de peso semanal. A eficiência alimentar e a sobrevivência dos camarões alimentados com a dieta contendo 2% de butirato foram maiores comparadas aos camarões da dieta controle. Os camarões alimentados com as dietas contendo 0,5% e 2% de butirato apresentaram maior produtividade final, retenção de nitrogênio e taxa de eficiência proteica. Os camarões alimentados com dieta suplementada com butirato em todas as concentrações analisadas apresentaram menor contagem de *Vibrio* sp. no intestino. Já a análise do DGGE, mostrou que a suplementação com butirato acima de 0,5% e o propionato acima de 1% causou alterações na comunidade bacteriana intestinal. Os camarões alimentados com dieta suplementada com 0,5% de butirato apresentaram maiores valores de título aglutinante do soro, quando comparados com os camarões do controle apenas antes do desafio. Por outro lado, a suplementação com butirato e propionato não alterou a contagem de hemócitos, título antimicrobiano do soro, atividade da fenoloxidase nem a mortalidade acumulada após o desafio com *Vibrio* sp. Portanto, a suplementação dietética de propionato e butirato de sódio em diferentes concentrações modifica a microbiota intestinal e melhora o crescimento do camarão marinho *L. vannamei*.

Palavras-chave: camarão branco do Pacífico, sais orgânicos, parâmetros zootécnicos, microbiota intestinal, parâmetros imunológicos, *Vibrio*.

14 ABSTRACT

Organic salts may promote an improvement in the efficiency of nutrient utilization, modify the intestinal microbiota, and increase disease resistance of marine shrimps. This study aimed at evaluating the effects of sodium butyrate and sodium propionate supplementation at different dietary inclusions levels in the growth of *Litopenaeus vannamei*. In total, seven diets were evaluated: a control diet (without supplementation), and three diets containing each sodium salt, propionate and butyrate, at 0.5%, 1%, and 2% concentrations. Treatments were evaluated in triplicate, totaling 21 experimental units of 6.000 L stocked with 150 shrimp (2.53 ± 0.03 g). After 47 days of culture, it was possible to shrimp growth performance, nitrogen and phosphorus retention, immunological and hematological parameters, changes in the microbial community of the gut, and survival after experimental challenge with *Vibrio* sp. pathogenic for marine shrimp. Shrimp fed with diets supplemented with propionate and butyrate, in all dietary concentrations, increased their final weight and weekly weight gain. Feed efficiency and shrimp survival fed with the diet containing 2% butyrate were higher in comparison with the control diet. Shrimp fed diets containing 0.5% and 2% butyrate achieved the highest final yield, nitrogen retention, and protein efficiency rate. Shrimp fed with the diet supplemented with butyrate, in all dietary inclusions showed lower counts of *Vibrio* sp. in the intestine through the microbiological count. Through DGGE analysis, it was possible to observe that supplementation with butyrate over 0.5% and propionate over 1% led to changes in the bacterial community of the intestine. Shrimp fed with the diet supplemented with 0.5% butyrate showed higher values of serum agglutination titer compared with the control, just before the challenge. However, supplementation with propionate and butyrate did not alter hemocyte counting, serum antimicrobial titer, phenoloxidase activity, and the cumulative mortality after *Vibrio* sp. challenge. Thus, it is possible to conclude that dietary supplementation with sodium propionate and sodium butyrate in different dietary concentrations alters the intestinal microbiota and improves the growth of the marine shrimp, *L. vannamei*.

Key words: Pacific white shrimp; organic salts; growth parameters; intestinal microbiota; immunological parameters; *Vibrio*.

15 INTRODUÇÃO

A necessidade de aumentar a produção mundial de alimentos, devido ao aumento populacional e a maior eficiência da aquicultura em produzir proteína, leva ao estímulo do crescimento desta atividade (De Silva, 2012). Contudo, dentre os principais problemas enfrentados no desenvolvimento da aquicultura estão as enfermidades. Na carcinicultura, o aparecimento de novas enfermidades causadas por enterobactérias, como a AHPNS na Ásia (do inglês, *Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome*) (Tran et al., 2013) e no México (Magallón-Barajas, 2013), estão ocasionando altas mortalidades em cultivos comerciais e conseqüentemente grandes perdas econômicas.

Além disso, o uso inapropriado de antibióticos na aquicultura, selecionando cepas de patógenos mais resistentes, bem como as restrições e proibições de seu uso na produção animal, aumentam a busca por aditivos alimentares, conhecidos como promotores de crescimento não antibióticos, que melhoram a saúde e nutrição dos organismos aquáticos (Lückstädt, 2006; Defoirdt et al., 2011). Neste contexto, pesquisas com ácidos orgânicos e seus sais merecem destaque (Lückstädt, 2008; Ng e Koh, 2011).

Os ácidos orgânicos e seus sais exercem efeitos sobre o desempenho zootécnico dos animais aquáticos durante os cultivos através de mecanismos distintos. Na dieta, funcionam como agentes de conservação, inibindo o crescimento microbiano e diminuindo uma possível ingestão de organismos patogênicos (Lückstädt, 2007). No intestino, inibem o crescimento de bactérias patogênicas, podendo alterar a microbiota intestinal (Defoirdt et al., 2009; Schryver et al., 2010; Mine e Boopathy, 2011) e, com isso, aumentar a sobrevivência no cultivo (Defoirdt et al., 2006, 2007; Liu et al., 2010; Nhan et al., 2011). Já no metabolismo animal, os ácidos orgânicos também podem afetar a ação de enzimas digestivas, ou ainda, podem servir como fonte de energia através dos ciclos do ácido cítrico ou do ácido carboxílico (Lückstädt, 2008). Além disso, os ácidos orgânicos podem alterar a disponibilidade e absorção de alguns nutrientes, como fósforo, lipídeos e aminoácidos (Baruah et al., 2005, 2007; Hossain et al., 2007; Morken et al., 2011; Khajepour e Hosseini, 2012; Sarker et al., 2012a, 2012b).

Todavia, estudos sobre a suplementação de ácidos orgânicos ou seus sais na engorda de camarões marinhos são escassos. Lückstädt (2008) relatou a existência de apenas dois estudos, onde a adição de 0,5% de citrato de sódio com lactobacilos inativados proporcionou o maior crescimento do camarão *Marsurpenaeus japonicus* e a

suplementação de 0,25% de formiato de cálcio melhorou a sobrevivência do *Penaeus monodon* em fazendas de Taiwan.

Mais dois estudos foram relatados em revistas de divulgação técnica. *Penaeus monodon* alimentado com dieta suplementada com 0,1% de produto comercial composto por 30-40% de butirato de sódio protegido com óleos vegetais, melhorou o desempenho no cultivo (Nuez-Ortin, 2011). Já *Litopenaeus vannamei* alimentado com dieta suplementada com 0,5% de diformiato de potássio (KDF) mostrou um aumento na produtividade (Kühlmann et al., 2011).

Silva et al. (2013) observaram o potencial de seis sais de sódio como aditivos alimentares para *L. vannamei* através da inibição de patógenos, atratividade, consumo e digestibilidade das dietas suplementadas, relatando bons resultados com propionato e butirato. Sendo assim, torna-se importante a realização de estudos de desempenho zootécnico com a utilização destes sais orgânicos avaliando os diversos aspectos em que esses aditivos alimentares podem atuar na nutrição e saúde de camarões marinhos. Com isso, este estudo teve como objetivo verificar os efeitos da suplementação do propionato de sódio e butirato de sódio em diferentes inclusões dietéticas na engorda do camarão branco do Pacífico, *L. vannamei*, avaliando o desempenho zootécnico, retenção corporal de nitrogênio e fósforo, parâmetros hematológicos e imunológicos dos camarões, alterações na comunidade microbiana intestinal e sobrevivência após desafio experimental com *Vibrio* sp.

16 MATERIAL E MÉTODOS

O preparo das dietas e a engorda experimental foram realizados no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM). Os desafios experimentais foram realizados no Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS). As extrações de DNA genômico do trato intestinal foram realizadas no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI). Todos os laboratórios pertencem à Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (UFSC). A análise de eletroforese em gel desnaturante (DGGE) foi realizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas, Brasil (UNICAMP).

16.1 Material Biológico

Os camarões *Litopenaeus vannamei* utilizados neste estudo foram provenientes da reprodução de uma linhagem livre de patógenos específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*) de notificação obrigatória (WSSV, IHHNV, TSV, IMNV e YHV) pela Organização Internacional de Epizootiases (OIE), e oriundos da empresa Aquatec Ltda. (Rio Grande do Norte, Brasil). Os camarões foram cultivados no LCM em sistema intensivo fechado com bioflocos bacterianos até atingirem o peso necessário para realização do experimento.

16.2 Preparo e análise das dietas

As dietas experimentais utilizadas nos ensaios foram formuladas para ser isonitrogenadas, isoenergéticas e para atender às exigências nutricionais do *L. vannamei* (NRC, 2011) (Tabela 7).

Os ingredientes secos da dieta foram previamente moídos e peneirados (500 μm), posteriormente os microingredientes homogeneizados em misturador Y por 10 min e então adicionados aos macroingredientes em um misturador de alimentos por mais 10 min. Após esse processo, foram adicionados os óleos, a lecitina de soja e 40% de água quente. A mistura resultante foi peletizada através de um moedor de carne e seca por aproximadamente 18 h a 40 °C. Os sais de ácidos orgânicos foram adicionados em suas respectivas quantidades substituindo o caulim, utilizado como ingrediente de preenchimento.

A composição centesimal das dietas foi realizada conforme a metodologia descrita pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*, 2005). A matéria seca (MS) foi calculada por análise gravimétrica após secagem em estufa a 100 °C durante 24 h. O teor de cinzas (CZ) foi determinado gravimetricamente por queima, num forno de mufla a 550 °C durante 6 h (942.05 em AOAC, 2005). O método de Kjeldahl (2001.11 em AOAC, 2005) foi usado para determinar o teor de proteína bruta (PB). Fibra bruta (FB) e extrato etéreo com hidrólise ácida (EEA) foram analisados pelos métodos 978.10 e 2003.05, respectivamente (AOAC, 2005). Os extratos não nitrogenados (ENN) foram calculados pela diferença entre a MS e a soma de CZ, FB, PB e EEA. Os valores de energia bruta foram determinados com um calorímetro adiabático.

O pH da dieta foi mensurado de acordo com a metodologia descrita por Baruah et al. (2005). Cinco gramas da ração foi macerada em gral de porcelana e misturada em 50 mL de água deionizada durante 1 min, utilizando um agitador magnético. Após a homogeneização da dieta o pH da solução foi mensurado.

A estabilidade do pélete foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Obaldo et al. (2002). Dez gramas de cada dieta em triplicata foram imersas em aquários de 61,5 L contendo água salgada, com 35 ppt de salinidade, pH 7,72 e temperatura de 28,8 °C. Os aquários continham aeração vertical constante. Após 2 h, as dietas foram secas a 105 °C até peso constante para determinar a estabilidade através da porcentagem de retenção de matéria seca (Tabela 8).

Tabela 7 – Composição da dieta referência utilizada no ensaio de crescimento em água clara com *Litopenaeus vannamei*.

Ingredientes	g.kg⁻¹
Farelo de soja (450 g.kg ⁻¹ PB)	350,0
Farinha de trigo	240,0
Farinha de Resido Peixe (590 g.kg ⁻¹ PB)	150,0
Farinha de Vísceras de Aves	120,0
Caulim	24,0
Fosfato monocálcico	22,3
Aglutinante (CMC)	20,0
Lecitina de soja	15,0
Premix mineral-vitamínico ¹	15,0
Cloreto de potássio	14,0
Óleo de peixe	13,2
Óleo de soja	8,4
Sulfato de magnésio	7,8
Vitamina-C ²	0,3

¹ –Níveis de garantia por quilo do produto: vit. A - 1.250.000 UI; vit. D3 - 350.000 UI; vit. E - 25.000 UI; vit. K3 - 500 mg; vit. B₁ - 5.000 g; vit B₂ 4.000 g; vit. B6 - 5.000 g; B₁₂ - 10 mg; ácido nicotínico - 15.000 mg ácido pantotênico - 10.000 mg; biotina - 150 mg; ácido fólico - 1,25 mg; vit. C - 25.000 mg; Colina - 50.000 mg; Inositol 30.000 mg; Ferro - 2.000 mg; Cobre - 3.500 mg; Cobre-quelado - 1.500 mg; Zinco - 10.500 mg; Zinco-quelado - 4.500 mg; Manganês - 4.000 mg; Selênio - 15 mg; Selênio-quelado - 15 mg; Iodo - 150 mg; Cromo - 80 mg e Veículo (q.s.p).

² - Vitamina-C: Rovimix Stay-C® 35%, DSM Produtos Nutricionais Brasil (São Paulo, Brasil).ácido L-ascórbico-2-monofosfato.

Tabela 8 – Composição centesimal ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), pH e estabilidade na água (%) das dietas avaliadas no ensaio de crescimento em água clara com *Litopenaeus vannamei*.

Nutriente	Controle	Propionato		Butirato			
		0,5%	1%	0,5%	1%		
Umidade	61,7	62,8	73,1	92,5	89,8	83,7	79,2
Proteína Bruta	352,2	349,1	345,4	337,3	344,0	337,9	336,6
Extrato etéreo	75,0	74,1	74,6	74,4	77,5	72,3	71,2
Fibra Bruta	39,5	21,9	39,1	20,8	30,0	35,6	19,4
Matéria Mineral	129,6	127,4	129,7	130,8	127,5	126,2	132,1
Extrato Não Nitrogenado	342,0	364,7	338,1	344,2	331,2	344,3	361,5
Energia ¹	4250	4240	4277	4185	4236	4233	4236
Fósforo	16,0	15,9	15,9	16,1	16,3	16,3	15,9
pH	6,20	6,24	6,32	6,35	6,22	6,26	6,31
Estabilidade na água ²	95,7±1,9	94,8±1,1	95,4±1,4	94,4±1,9	95,3±0,3	92,4±2,1	94,1±1,1

¹cal.g⁻¹.² porcentagem de retenção de matéria seca após 2 h.

16.3 Ensaio de crescimento

Ao total, foram avaliadas sete dietas: dieta controle (sem suplementação) e três dietas de cada sal de sódio, propionato e butirato, nas concentrações de 0,5%, 1% e 2%. Os tratamentos foram avaliados em triplicata, totalizando 21 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi povoada com 150 camarões com média de 2,53 g (2,2 – 2,8 g), resultando em uma densidade de 12 camarões·m². As unidades foram constituídas de tanques de fibra de vidro de 12,5 m² (6.000 L), possuindo aeração constante, aquecedores de 3.000 W controlados por termostato regulado a 29 ± 0,4 °C. Os tanques também continham um sistema de renovação estática onde eram renovados aproximadamente 50% do volume total do tanque por dia. Diariamente foram mensurados duas vezes a temperatura e oxigênio dissolvido e, semanalmente foram mensurados salinidade, pH, amônia total e nitrito. As dietas foram fornecidas quatro vezes ao dia (8:00, 11:00; 14:00 e 17:00) e controladas pelo consumo.

O oxigênio dissolvido e a temperatura foram mensurados com oxímetro (YSI, modelo Pro 20) e o pH com pHmetro (YSI, modelo Professional Plus). As análises de amônia total e nitrito foram realizadas segundo metodologia do APHA (1995).

Após 47 dias, foi realizada uma biometria final de todos os camarões de cada unidade experimental para obtenção dos parâmetros zootécnicos, como: peso final, ganho de peso semanal, produtividade, eficiência alimentar e sobrevivência. Ao mesmo tempo, foram coletados 10 camarões por unidade experimental para posterior análise e cálculo da retenção de nitrogênio e fósforo e taxa de eficiência proteica.

$$\text{Retenção (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Bf} \times \text{Ncf}) - (\text{Bi} \times \text{Nci})}{\text{Ingestão total de Nutrientes}}$$

Onde, Bf – Biomassa final, Ncf – Nutriente (nitrogênio ou fósforo) corporal final, Bi – Biomassa inicial, Nci - Nutriente (nitrogênio ou fósforo) corporal inicial.

$$\text{Taxa de eficiência proteica (TEP)} = \frac{\text{Ganho de peso (g)}}{\text{Consumo total de proteína (g)}}$$

Após a biometria final os camarões foram mantidos por mais dez dias consumindo as respectivas dietas experimentais, conforme anteriormente, para realização do desafio experimental.

16.4 Avaliações da microbiota intestinal

Aos 27 e 47 dias de cultivo cinco camarões de cada unidade experimental foram amostrados para a formação de um *pool* por unidade para realizar a contagem bacteriológica do intestino. Os intestinos médios dos camarões foram extirpados com auxílio de pinças e bisturi, homogeneizados em solução salina estéril a 3% de NaCl em um graal. Em seguida, as amostras foram diluídas serialmente (1/10), semeadas em meio de cultura Agar Marine (para bactérias marinhas heterotróficas totais) e Agar de Tiosulfato, Citrato, Bile e Sacarose (TCBS, meio seletivo para vibrios), e incubadas em estufa a 29 °C durante 24 h.

A microbiota intestinal dos camarões também foi avaliada por PCR-DGGE (do inglês, *Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Aos 47 dias de cultivo, cinco camarões de cada unidade experimental foram amostrados para a formação de um *pool* por unidade, os intestinos médios foram extirpados assepticamente e congelados imediatamente em nitrogênio líquido (-196 °C) para posterior extração do DNA. Aproximadamente 25 mg das amostras de intestino foram pesadas e posteriormente feitas as extrações de DNA genômico total com o QIAGEN DNA mini kit (Cat# 51304, Qiagen, Valencia, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração, a integridade e quantidade do DNA genômico foram avaliados por espectrofotômetro (Thermo Scientific Nanodrop; Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA), utilizando-se 2 µL de cada amostra. Todas as amostras mantiveram $ABS_{260/280}$ entre 1,86-2,01 e quantidade de DNA entre 50 a 120 ng·µL⁻¹.

A amplificação do gene RNA ribossomal 16S foram realizadas por reações de PCR com as amostras de DNA do intestino dos camarões utilizando o par de primers 341f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), acoplado a um grampo com alto conteúdo de GC (341f-GC) e 907r (5'-CCGTC AATTCCTTTRAGTTT-3') (Teske et al., 1996), homólogos a regiões conservadas do gene RNAr 16S do Domínio Bactéria. Para tanto, aproximadamente 50 ng do DNA foram usados em reações de 50 µL que continham 0,5 pmol·µL⁻¹ de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, tampão 1x da enzima e 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase. As amplificações foram realizadas com temperatura inicial de 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 2 min, seguidos de mais 10 ciclos de 60 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min. A qualidade dos produtos de PCR foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com 0,02 µL/mL *SYBR Safe 10.000x in DMSO* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel com gradiente desnaturante no sistema Ingeny phor U-2 (Ingeny International BV, Goes, The Netherlands), em que 25 µL de cada amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida 6% a uma voltagem de 100 V por 15 h. O gradiente desnaturante do gel utilizado para separação dos fragmentos de DNA foi de 45% a 65%. Após a eletroforese, o gel foi corado com 10 µL de solução contendo 2,5 µL de *SYBR Gold* (Invitrogen, Carlsbad, CA) em tampão TAE 0,5X por 40 min em ausência de luz. Em seguida o gel foi fotografado em sistema de fotodocumentação Image Quant LAS 4.000 (GE Healthcare, Chalfont St Giles, England).

16.5 Desafio experimental

Para realização dos desafios experimentais foi utilizada uma cepa de *Vibrio* sp. (CPQBA 378-12 DRM01) isolada da hemolinfa de camarões *L. vannamei* reprodutores, mantidos no setor de maturação do LCM, sintomáticos com melanização cutânea, durante um surto de mortalidade. A cepa foi identificada através do sequenciamento de fragmentos do gene RNA ribossomal 16S como *Vibrio* sp. (dados não publicados), apresentando alta similaridade na análise filogenética com as cepas de *Vibrio natriegens* e *Vibrio alginolyticus* (Figura 5).

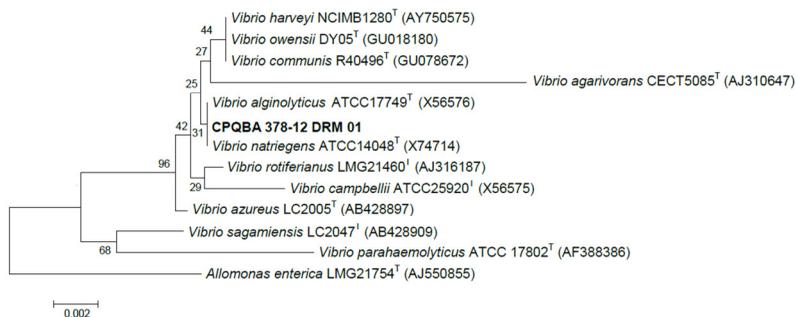


Figura 5 – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as seqüências parciais do gene RNA ribossomal 16S da cepa de *Vibrio* isolado de hemolinfa de camarões em surto de mortalidade e utilizado nos desafios experimentais (CPQBA 378-12-DRM 01) e seqüências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e GenBank.

Para o desafio experimental utilizou-se a dose letal 50 (DL₅₀) de 2,92 x 10⁵ unidades formadoras de colônia (UFC) por camarão,

determinada para esta cepa em ensaio anterior com camarões com peso de $11,5 \pm 1,2$ g crescidos em água clara e mantidos em aquários a 28 °C. Neste ensaio os camarões estabilizaram sua mortalidade 54 h após a infecção (dados não publicados).

No desafio experimental 20 camarões de cada unidade experimental foram transferidos para 21 aquários de 40 L contendo aquecimento (28 °C) e aeração constante, obedecendo ao mesmo delineamento experimental da engorda. O inóculo crescido em caldo de coração e cérebro (BHI, do inglês, *Brain and Heart Infusion*) por 18 h em 28 °C foi centrifugado por 30 min a 1800 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em solução salina estéril 3,0% em proporção tal que a suspensão se mantivesse em 1×10^8 UFC·mL⁻¹, segundo a curva de crescimento realizada anteriormente. Posteriormente, a suspensão foi diluída até a concentração desejada para o desafio. Os camarões foram injetados com 100 µL na parte dorsal do primeiro segmento abdominal. A mortalidade foi acompanhada até 96 h após o desafio.

16.6 Análises hemato-imunológicas

Antes do desafio experimental, a hemolinfa de dez animais por unidade experimental, foi coletada para formar dois *pools*, enquanto que após o desafio foi coletada a hemolinfa de cinco animais por unidade experimental (um *pool*). As amostras foram coletadas com seringas estéreis de 1 mL de agulha 21G resfriadas a 4 °C. Da hemolinfa coletada de cada animal, uma amostra de 40 µL foi fixado em solução de 4% de formaldeído/MAS (citrato de sódio 27 mM, EDTA 9 mM, glicose 115 mM, NaCl 336 mM, pH 7,0) para contagem total de hemócitos (THC), e o restante foi deixado coagular a 4 °C. A hemolinfa coagulada foi congelada a -20 °C e centrifugada repetidamente a 10.000 g por 10 min para obtenção do soro, e este aliqotado e estocado a -20 °C para uso posterior nas demais análises imunológicas.

O número de hemócitos por mililitros de hemolinfa foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer considerando-se a diluição.

Para determinar o título aglutinante, as amostras de 50 µL de soro foram diluídas serialmente em TBS-1 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7.4) em placas de 96 micropoços com fundo côncavo. Depois, cada poço recebeu 50 µL de solução 2% de eritrócitos de cachorro em solução TBS-1 e incubados por 3 h a 25 °C em câmara úmida. O controle foi realizado substituindo o soro por TBS-

1. O título aglutinante foi definido como o recíproco da maior diluição capaz de aglutinar os eritrócitos (segundo Maggioni et al, 2004).

O título antimicrobiano do soro foi determinado contra a bactéria marinha Gram-negativa *Vibrio* sp., a mesma utilizada no desafio, além da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. O *Vibrio* sp. foi cultivado em água salina peptonada (PWS, do inglês, *Peptone Water Saline*: 1,0% de peptona e 3% de NaCl) enquanto o *S. aureus* foi cultivado em caldo peptona (PB, do inglês, *Peptone Broth*, 1% de peptona e 0,5% de NaCl) ambas incubadas a 29 °C por 20 h. Os ensaios foram em microplaca de 96 poços de fundo chato, segundo a metodologia descrita por Silva et al. (2009). O crescimento bacteriano de cada poço foi avaliado em leitora de microplaca em DO_{550nm} , após 12 h de incubação para o *Vibrio* sp. e 24 h para a *S. aureus*, ambas a 29 °C. Com isso, foi possível determinar o título antimicrobiano, ou seja, a menor concentração do soro capaz de inibir o crescimento bacteriano de cada cepa.

A atividade da fenoloxidase (PO) foi determinada no soro por espectrofotometria (DO_{490nm}) pela formação do pigmento DOPA-cromo, após a oxidação do substrato L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), através da metodologia descrita por Söderhäll e Häll (1984). Primeiramente, amostras do soro (2 pools de 5 animais por tratamento) foram diluídos (1:8) em TBS-2 (1 mM Tris, 336 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, pH 7.6). Desta solução, 50 μ L foi incubada em um volume igual de tripsina (1 mg·mL⁻¹) por 15 min à 20 °C em placas de 96 micropoços. Após a incubação, 50 μ L de solução L-DOPA (3 mg·L⁻¹) foi adicionado a cada poço. O controle foi feito com 50 μ L de TBS-2 em substituição da tripsina. A formação do DOPA-cromo foi monitorada nos tempos 0, 5, 15 e 20 min depois da adição da solução L-DOPA. Uma unidade de atividade específica da PO foi equivalente à variação de 0,001 na absorbância·min⁻¹·miligramma de proteína⁻¹. A concentração de proteína na hemolinfa foi estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro-albumina bovina como padrão.

16.7 Análises dos dados

Antes de serem submetidos às análises estatísticas, os dados de contagem bacteriológica foram transformados em $\log_{10}(x+1)$ e os dados do título de aglutinação e título antimicrobiano do soro foram transformados em $\log_2(x+1)$. A homocedasticidade dos dados foi avaliada pelo teste de Bartlett e posteriormente os dados zootécnicos, de retenção de nitrogênio e fósforo, além da taxa de eficiência proteica e de

mortalidade após o desafio foram submetidos à análise de variância unifatorial. Os dados dos parâmetros de qualidade de água, contagem bacteriológica e hemato-imunológica foram analisados por análise de variância com parcela subdividida no tempo. Caso necessário, a separação de médias, esta foi realizada pelo teste de Student Newman Keuls (SNK). Todos os testes estatísticos foram avaliados ao nível de significância de 5%.

Os resultados de similaridade entre a comunidade bacteriana intestinal realizados pelo DGGE foram avaliados através de uma análise de agrupamento, utilizando o método de classificação hierárquico UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*) com auxílio do software *BioNumerics versão 6.6* (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

17 RESULTADOS E DISCUSSÃO

17.1 Parâmetros de qualidade de água

A temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, pH, nitrogênio amoniacal total e nitrogênio de nitrito se mantiveram com baixa variação ao longo do cultivo, com valores médios de 28,8 °C (27,5 – 29,4 °C); 4,9 mg·L⁻¹ (4,4 – 5,8 mg·L⁻¹); 35 ppt (34 – 37 ppt); 7,9 (7,6 – 8,1); 0,6 mg·N-NH₄·L⁻¹ (0,1 – 1,4 mg·N-NH₄·L⁻¹), 0,1 mg·N-NO₂·L⁻¹ (0,0 – 0,3 mg·N-NO₂·L⁻¹), respectivamente, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos. Todos os parâmetros de qualidade de água analisados se mantiveram dentro de padrões aceitáveis para o cultivo de camarões marinhos (Boyd e Gautier, 2000).

17.2 Parâmetros zootécnicos

Os camarões alimentados com as dietas suplementadas com o propionato e butirato (0,5, 1 e 2%) obtiveram maior peso final e ganho de peso semanal. A eficiência alimentar e a sobrevivência dos camarões alimentados com a dieta contendo 2% de butirato e a produtividade dos suplementados com 0,5% e 2% de butirato também apresentaram maiores valores em relações aos camarões alimentados com a dieta controle (Tabela 9).

Estudos com a suplementação de sais orgânicos indicaram melhoria no desempenho zootécnico de camarões marinhos. Nuez-Ortiz (2011) relatou o aumento de 9% no ganho de peso e 3% na sobrevivência de *P. monodon* com a suplementação dietética de 0,1% de um produto comercial a base de butirato de sódio protegido.

Um estudo realizado pelo nosso grupo também observou o aumento de ganho de peso e taxa de crescimento específico de *L. vannamei* em fase de berçário suplementados com 73 mM de propionato, butirato, fumarato e succinato em dieta comercial (dados não publicados). Resultados com suplementação de acidificantes em camarões marinhos também são contraditórios. *L. vannamei* alimentados com dieta suplementada com 0,5% de KDF apresentaram aumento de 19% na produtividade (Kühlmann et al., 2011). Contudo, a suplementação dietética de 0,05-0,2 % de alginato de sódio (polissacarídeo contendo grupos carboxílicos) não causou melhorias no crescimento e sobrevivência na engorda de *L. vannamei* (Cheng et al., 2005).

Tabela 9 – Parâmetros zootécnicos de *Litopenaeus vannamei* cultivado em água clara com suplementação dietética de propionato de sódio e butirato de sódio em diferentes concentrações.

Tratamentos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso semanal (g)	Produtividade (kg.ha ⁻¹)	Eficiência alimentar	Sobrevivência (%)
Controle	2,53±0,02	9,32±0,90 ^b	0,94±0,06 ^b	992±89 ^b	0,53±0,03 ^b	88,7±0,6 ^b
Propionato 0,5%	2,56±0,03	10,20±0,25 ^a	1,14±0,04 ^a	1113±7 ^{ab}	0,59±0,04 ^{ab}	91,0±2,0 ^{ab}
Propionato 1%	2,52±0,03	10,16±0,13 ^a	1,14±0,02 ^a	1085±28 ^{ab}	0,52±0,03 ^b	89,0±2,0 ^{ab}
Propionato 2%	2,52±0,03	10,35±0,06 ^a	1,17±0,01 ^a	1093±88 ^{ab}	0,55±0,01 ^{ab}	92,3±1,2 ^{ab}
Butirato 0,5%	2,52±0,02	10,60±0,15 ^a	1,20±0,02 ^a	1176±5 ^a	0,59±0,01 ^{ab}	92,3±1,5 ^{ab}
Butirato 1%	2,53±0,03	10,25±0,08 ^a	1,15±0,01 ^a	1100±0 ^{ab}	0,55±0,01 ^{ab}	89,3±0,6 ^{ab}
Butirato 2%	2,53±0,03	10,82±0,53 ^a	1,24±0,08 ^a	1237±23 ^a	0,61±0,01 ^a	93,0±1,4 ^a
Valor-p	0,6899	0,0021	0,0008	0,0109	0,0222	0,0126

* Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%.

17.3 Utilização de nitrogênio e fósforo

Os camarões alimentados com as dietas contendo 0,5% e 2% de butirato apresentaram maior porcentagem de retenção de nitrogênio e maior taxa de eficiência proteica comparado com os camarões alimentados com a dieta controle. Já na retenção de fósforo não mostrou diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 10).

Tabela 10 – Retenção corporal de nitrogênio e fósforo e taxa de utilização proteica de *Litopenaeus vannamei* cultivado em água clara com suplementação dietética de propionato de sódio e butirato de sódio em diferentes concentrações.

Tratamento	Retenção de nitrogênio (%)	Retenção de fósforo (%)	Taxa de eficiência proteica
Controle	74,15±5,05 ^b	19,28±0,72	1,05±0,07 ^c
Propionato 0,5%	88,45±8,98 ^{ab}	20,09±0,80	1,18±0,04 ^{cb}
Propionato 1%	74,88±3,91 ^b	18,89±3,05	1,07±0,08 ^c
Propionato 2%	76,60±7,16 ^b	19,37±3,27	1,17±0,05 ^{cb}
Butirato 0,5%	94,70±3,35 ^a	20,51±1,05	1,26±0,01 ^b
Butirato 1%	82,18±5,34 ^{ab}	20,20±1,23	1,18±0,01 ^{cb}
Butirato 2%	96,97±4,57 ^a	20,12±3,57	1,37±0,05 ^a
Valor-p	0,0042	0,9100	0,0004

* Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%.

Trabalhos com camarões marinhos avaliando a utilização de nitrogênio e fósforo das dietas com a suplementação de ácidos orgânicos ou seus sais são escassos. Nuez-Ortiz (2011) relata o aumento de aproximadamente 4% na digestibilidade da proteína com a suplementação de 0,1% de butirato de sódio em *P. monodon*. Já outro estudo com *L. vannamei* não apresentou melhorias significativas na digestibilidade da proteína com a suplementação de 2% de butirato ou propionato em dieta comercial (formulação desconhecida), o que pode explicar a diferença na utilização do nitrogênio entre os dois trabalhos, pois possivelmente as quantidades de proteínas derivadas do farelo de soja e farinha de peixe são diferentes entre as duas dietas. Além disso, a dieta comercial apresentava outras fontes proteicas, como proteína de milho e concentrado proteico de soja (Silva et al., 2013).

Silva et al. (2013) também relataram o aumento da digestibilidade de fósforo com a suplementação de 2% de propionato de sódio. Contudo, no presente estudo não houve uma maior retenção corporal de fósforo nos camarões suplementados com propionato. Uma hipótese para explicar este resultado é que o camarão, apesar de absorver mais fósforo no trato intestinal com suplementação de sais orgânicos, não aumenta a retenção corporal deste nutriente, geralmente acumulado no hepatopâncreas e na carapaça (Davis et al., 1993), utilizando-o nos seus processos metabólicos. Porém, mais estudos devem ser feitos para esclarecer os efeitos da suplementação dietética de sais orgânicos na utilização de nitrogênio e fósforo pelos camarões marinhos.

Em peixes, a retenção de nitrogênio e fósforo com a suplementação de ácido cítrico já é conhecida. A suplementação de ácido cítrico aumentou a retenção de nitrogênio e fósforo em pargo vermelho (*Pagrus major*) (Sarker et al., 2005; Hossain et al., 2007) e a retenção de fósforo em olhete (*Seriola quinqueradiata*) (Sarker et al., 2012a, 2012b) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Hernandez et al., 2012).

17.4 Comunidade bacteriana intestinal

Diversos estudos já relataram a mudança na comunidade bacteriana ou redução de vibrios no intestino de camarões marinhos com a utilização de bactérias probióticas ácido lácticas (Castex et al., 2008; Vieira et al., 2008, 2010; Kongnum e Hongpattarakere, 2012). Porém, sabendo que os principais responsáveis pela inibição de bactérias patogênicas são os ácidos orgânicos produzidos pelos probióticos (Vazquez et al., 2005), poucos estudos foram realizados avaliando a alteração da microbiota intestinal com a suplementação de ácidos orgânicos ou seus sais em animais aquáticos, principalmente em camarões marinhos.

Neste estudo, o trato intestinal dos camarões alimentados com dieta suplementada com 0,5 a 2% de butirato apresentou menor contagem de vibrios em relação aos demais tratamentos, havendo diferenças entre os diferentes tempos analisados (27 e 47 dias de cultivo) na análise de variância, porém não detectada pela análise de SNK. Já a contagem de bactérias heterotróficas totais não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos e os tempos analisado (Tabela 11).

Tabela 11 – Contagem bacteriológica do trato intestinal de *Litopenaeus vannamei* cultivado em água clara com suplementação dietética de propionato de sódio e butirato de sódio em diferentes concentrações e em dois períodos de alimentação.

Tratamentos	MARINE		TCBS	
	$(\log_{10} \text{ UFC.g}^{-1})$		$(\log_{10} \text{ UFC.g}^{-1})$	
	27 dias	47 dias	27 dias	47 dias
Controle	8,64±0,05	8,53±0,25	8,02±0,26 ^{Aa}	7,36±0,46 ^{Aa}
Propionato 0,5%	9,23±0,17	8,26±0,60	7,78±0,71 ^{Aa}	7,65±0,55 ^{Aa}
Propionato 1%	9,16±0,53	8,48±0,08	7,85±0,48 ^{Aa}	7,38±0,56 ^{Aa}
Propionato 2%	8,66±0,62	8,50±0,89	7,77±0,74 ^{Aa}	7,34±0,13 ^{Aa}
Butirato 0,5%	7,86±0,29	7,48±0,02	6,22±0,36 ^{Ab}	6,81±0,38 ^{Ab}
Butirato 1%	8,03±0,56	8,04±0,75	6,55±1,01 ^{Ab}	5,49±1,41 ^{Ab}
Butirato 2%	9,07±0,27	8,79±0,33	6,38±0,59 ^{Ab}	6,24±1,85 ^{Ab}
Valor-P	Tratamento	0,1494		0,0022
	Tempo	0,2610		0,04725
	Interação	0,1808		0,2509

* Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%. Letras maiúsculas indicam diferenças no período de suplementação. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos.

Em outro estudo, a suplementação dietética por 14 dias de 2% de propionato reduziu a contagem de vibrios no trato intestinal de *L. vannamei*, enquanto que a suplementação de 2% de butirato não proporcionou diferenças na contagem de vibrios do trato intestinal dos camarões, alimentados ou não com dieta suplementada com os demais sais orgânicos (Silva et al., 2013). Essa diferença entre os dois estudos pode se dar pelo diferente tempo de administração das dietas suplementadas com sais orgânicos, ou pela alta variância dos resultados e pouca sensibilidade nas análises realizadas através de contagens microbiológicas em meios de cultura.

Através do dendograma formado pela análise do DGGE observou-se que a suplementação com butirato acima de 0,5% e o propionato acima de 1% causaram maiores alterações na comunidade bacteriana do intestino dos camarões, apresentando valores de similaridade entre 50 a 40% com a comunidade dos camarões alimentados com a dieta controle. As comunidades bacterianas intestinais mais semelhantes foram detectadas entre os camarões suplementados com butirato 0,5% e 1,0%, com 92% de similaridade, e entre os camarões alimentados com a dieta controle e propionato 0,5% com 84% de similaridade (Figura 6).

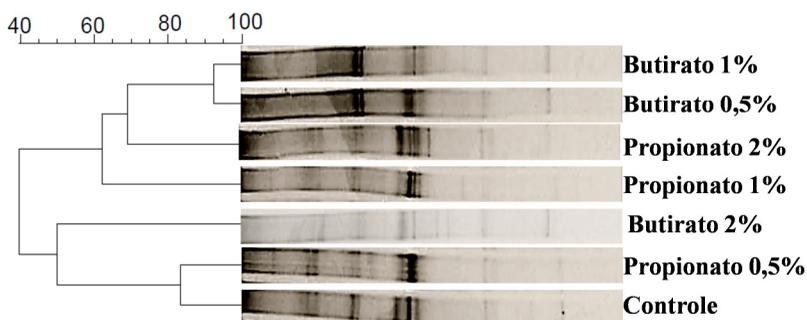


Figura 6 - Dendrograma de similaridade dos perfis de bandas das amostras de DNA bacteriano amplificado, extraído do intestino de camarões *L. vannamei* cultivados em água clara com suplementação dietética de propionato de sódio e butirato de sódio em diferentes concentrações.

Em outro estudo com *L. vannamei*, a comunidade bacteriana intestinal dos camarões suplementados com 0,4 - 2% de sulfato de cálcio apresentou pela análise de DGGE apenas 64% de similaridade com a comunidade intestinal dos camarões do controle (Anuta et al., 2011). Em robalo europeu (*D. labrax*) a suplementação de 2 a 10% de polihidroxibutirato (PHB) também alterou a comunidade bacteriana do trato intestinal, chegando a porcentagens de similaridades, pelo teste de DGGE, de aproximadamente 40% com a comunidade dos peixes controle (Schryver et al., 2010).

17.5 Desafio experimental

Não foi observada diferença significativa na mortalidade entre os camarões alimentados com dieta suplementada com butirato e propionato nas diferentes concentrações e os camarões alimentados com a dieta controle. A mortalidade se estabilizou após 64 h da infecção e as médias dos tratamentos ficaram entre 30 a 40% (Tabela 12).

Em estudos com aditivos alimentares, como probióticos, β -glucanos e nucleotídeos, tem-se observado o aumento da sobrevivência de camarões marinhos, após o desafio com *Vibrio* (Vieira et al., 2007, 2010; Chang et al., 2011; Biswas et al., 2012; Kongnum e Hongpattarakere, 2012).

Contudo, pouco se sabe sobre a resposta da suplementação da dieta com ácidos orgânicos ou seus sais em camarões marinhos contra uma infecção com *Vibrio*. Cheng et al. (2005) observaram que a

suplementação de 0,05% a 0,2% de alginato de sódio aumentou a sobrevivência de *L. vannamei* injetados com *V. alginolyticus* pela região ventral do cefalotórax, com valores entre 30 a 43,3% de sobrevivência contra 13,3% dos camarões não suplementados.

Tabela 12 – Sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* cultivados em água clara com suplementação dietética de propionato de sódio e butirato de sódio em três diferentes concentrações (0,5; 1 e 2%) e desafiados intramuscular com 100 µL de *Vibrio* sp. contendo $2,92 \times 10^5$ unidades formadoras de colônia por camarão (DL₅₀).

Tratamento	Mortalidade (%)
Controle	36,19 ± 9,28
Propionato 0,5%	40,02 ± 17,35
Propionato 1%	30,75 ± 14,97
Propionato 2%	37,08 ± 4,50
Butirato 0,5%	40,00 ± 10,26
Butirato 1%	39,01 ± 8,05
Butirato 2%	40,12 ± 9,93
Valor-p	0,9786

Neste estudo, apesar da redução de vibrios no trato intestinal dos camarões e da melhor sobrevivência durante a engorda, a suplementação de sais orgânicos não alterou a sobrevivência após o desafio com *Vibrio* sp. Porém, é necessário considerar alguns aspectos, como a via de infecção e a dose. O desafio foi realizado com uma injeção intramuscular e com doses altas, gerando uma infecção aguda. Mais estudos utilizando diferentes concentrações de sais orgânicos, doses menores ou com vias alternativas de desafio, podem ser avaliados para verificar uma situação mais próxima do que ocorre nos cultivos.

17.6 Análises hemato-imunológica

A contagem total de hemócitos (THC) apresentou valores mais baixos após o desafio, contudo não foram observadas diferença entre os tratamentos antes ou após a infecção (Tabela 13). Outros trabalhos com desafio experimental de *L. vannamei* com *V. alginolyticus*, utilizando doses de 1×10^5 UFC por camarão, também observaram redução do THC após o desafio, porém, apenas entre 12 a 24 h (Hsieh et al., 2008) e entre 12 a 48 h (Li et al., 2006). *L. vannamei* alimentados com dietas suplementadas com diferentes concentrações de alginato de sódio (0,05 a 0,2%) não apresentaram alterações na THC, corroborando com os resultados deste estudo (Cheng et al., 2005; Liu et al., 2006). Porém, a

suplementação dietética de *L. vannamei* com 1,2 e 2% do ácido inorgânico sulfato de cálcio aumentou a THC (Anuta et al., 2011).

Exceto para os camarões suplementados com 1% de propionato, os outros alimentados com dietas contendo propionato e butirato apresentaram título de aglutinação do soro mais elevada do que dos camarões do tratamento controle, antes e após o desafio (Tabela 13). No entanto, poucos estudos com uso de aditivos alimentares para camarões têm avaliado a resposta do título de aglutinação. Em estudo com *L. vannamei* alimentados com dieta suplementada com a cepa probiótica *Lactobacillus plantarum*, ao contrário do presente estudo, não houve diferenças significativas no título de aglutinação do soro em comparação com os camarões de controle antes do desafio. Porém, após o desafio com o *V. harveyi*, os camarões suplementados com probióticos apresentaram valores mais elevados (Vieira et al., 2010).

O título antimicrobiano da hemolinfa dos camarões contra a cepa Gram-positiva (*S. aureus*) foi mais elevado após a infecção com *Vibrio*, enquanto o título antimicrobiano contra a cepa Gram-negativa (*Vibrio* sp.) e a atividade da fenoloxidase (PO) não apresentaram alterações significativas com o desafio. Todavia, estes parâmetros não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 13). O título antimicrobiano é uma forma indireta de avaliar os peptídeos antimicrobianos. Estas moléculas possuem um papel importante na resposta humoral inata dos crustáceos, atuando como antibióticos naturais contra uma diversidade de microrganismos. Rosa e Barracco (2010) relatam estudos onde se observou que peneídeos após uma infecção com *Vibrio* aumentam a expressão gênica nas primeiras horas do peptídeo antimicrobiano ALF, principal responsável pela inibição de bactérias Gram-negativas. Enquanto que 24 a 72 h após a infecção há um aumento da expressão de outros antimicrobianos como as crustinas e peneidinas, que atuam principalmente contra bactérias Gram-positivas. Este relato pode explicar o resultado de nosso estudo, já que o soro dos camarões possuía atividade antimicrobiana apenas contra a cepa de *S.aureus*. Porém, a suplementação de butirato e propionato não interferiu na resposta antimicrobiana do soro antes ou após o desafio nas condições avaliadas.

Tabela 13 – Parâmetros hematológicos e imunológicos de *Litopenaeus vannamei* cultivado em água clara com suplementação dietética de propionato de sódio e butirato de sódio em diferentes concentrações.

Desafio	Tratamentos	THC(10 ⁶ cels.mL ⁻¹)	Aglutinação (log ₂ x+1)	Anti-Vibrio sp. (log ₂ x+1)	Anti-S. Aureus (log ₂ x+1)	Atividade PO (unit.min ⁻¹ .mg ⁻¹)
Antes	Controle	23,54±6,04 ^A	13,67±2,31 ^{Bb}	2,33±0,57	3,00±0,00 ^B	47,45±7,04
	Propionato 0,5%	22,94±9,63 ^A	16,67±1,53 ^{Ba}	2,66±0,57	3,33±0,57 ^B	43,14±4,96
	Propionato 1%	27,52±2,59 ^A	15,33±0,58 ^{Bab}	2,33±0,57	3,66±0,57 ^B	37,50±0,73
	Propionato 2%	22,03±1,05 ^A	16,00±0,00 ^{Ba}	2,66±0,57	3,00±0,00 ^B	46,07±10,64
	Butirato 0,5%	21,67±2,62 ^A	17,33±0,58 ^{Ba}	2,33±0,57	3,33±0,57 ^B	49,33±13,59
	Butirato 1%	23,07±2,00 ^A	16,67±0,58 ^{Ba}	2,33±0,57	3,00±0,00 ^B	48,64±5,88
Depois	Butirato 2%	22,27±1,98 ^A	16,50±0,71 ^{Ba}	3,00±0,00	3,00±0,00 ^B	51,66±4,24
	Controle	13,07±7,00 ^B	18,67±0,58 ^{Ab}	2,66±0,57	4,33±0,57 ^A	40,93±3,30
	Propionato 0,5%	15,37±2,97 ^B	22,00±2,00 ^{Aa}	2,66±0,57	4,00±0,00 ^A	41,65±10,94
	Propionato 1%	20,10±9,90 ^B	19,50±2,12 ^{Aab}	3,00±0,00	4,00±0,00 ^A	43,68±3,67
	Propionato 2%	16,05±4,85 ^B	21,50±2,12 ^{Aa}	3,00±0,00	4,00±0,00 ^A	43,14±2,47
	Butirato 0,5%	13,17±5,31 ^B	20,33±2,08 ^{Aa}	2,00±0,00	4,00±0,00 ^A	42,37±7,04
Valor-p	Butirato 1%	23,27±6,50 ^B	21,33±1,15 ^{Aa}	3,00±0,00	4,00±0,00 ^A	33,06±10,55
	Butirato 2%	18,23±6,38 ^B	20,00±0,00 ^{Aa}	2,00±1,00	3,66±0,57 ^A	37,02±7,56
	Tratamento	0,0762	0,0431	0,3759	0,5901	0,5791
	Tempo	0,0001	0,0001	0,4641	0,0002	0,1035
	Interação	0,0706	0,7549	0,0873	0,2559	0,6107

* Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%. Letras maiúsculas indicam diferenças no tempo. Letras minúsculas indicam diferenças entre os tratamentos.

Outra resposta importante do sistema humoral inato para os camarões marinhos é a atividade da enzima PO. Li et al. (2008) observaram diminuição da atividade da PO no soro de *L. vannamei* infectados com 1×10^5 UFC por camarão de *V. alginolyticus*, voltando a valores basais após 120 h. Neste estudo, após 96 h do desafio não foi possível detectar alterações na PO com a inoculação de $2,93 \times 10^5$ UFC por camarão. Porém, no outro estudo, os autores utilizaram uma temperatura de 24 °C, enquanto nesse estudo a temperatura do desafio foi de 28 °C. Estudos com alginato de sódio relatam resultados contraditórios em relação à atividade da PO, enquanto a suplementação de 0,1% e 2% de alginato aumentou a atividade da PO para *L. vannamei* (Cheng et al., 2005), não alterou para *P. monodon* (Liu et al., 2006).

18 CONCLUSÃO

A suplementação dietética de propionato e butirato de sódio em diferentes concentrações modifica a microbiota intestinal e melhora o crescimento do camarão marinho *L. vannamei*. Além disso, a suplementação do butirato de sódio melhora a retenção de nitrogênio, taxa de eficiência proteica, e título de aglutinação do soro, melhorando consequentemente a eficiência alimentar, sobrevivência e produtividade. Contudo, o propionato e butirato não foram capazes de melhorar a sobrevivência após o desafio com *Vibrio* nas condições analisadas.

19 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo suporte no projeto “Bases Nutricionais para o Desenvolvimento de Dietas voltadas para o Cultivo do Camarão *Litopenaeus vannamei* em Regime Intensivo com Flocos Microbianos e Troca Mínima de Água – FINEP/RECARCINA - 2010-2012. Agradecemos também o suporte do Dr. Mauricio Laterça Martins do Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS-UFSC), o suporte da Dra. Maria Risoleta Freire Marques e Msc. Ana Paula de Medeiros Fraga do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), e pelo suporte técnico de Marcello Mendes, Scheila Anelise Pereira e Joselle Cursino Redig.

20 REFERÊNCIAS

Anuta, D.J., Buentello, A., Patnaik, S., Lawrence, A.L., Mustafa, A., Hume, M., Gatlin III, D.M., Kemp, M.C., 2011. Effect of dietary supplementation of acidic calcium sulfate (vitoxal) on growth, survival, immune response and gut microbiota of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. World Aquacult. Soc. 42, 834-844.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists, 1999. Official Methods of Analyses. 16th ed., Arlington, VA.

APHA, AWWA. "WEF, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association." Inc., Baltimore, MD USA.

Baruah, K., Paul, A.K., Sahu, N.P., Jain K.K., Mukherjee, S.C., Debnath, D., 2005. Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. Aquac. Res. 36, 803 – 812.

Baruah, K., Sahu, Pal, A.K., Debnath, D., Yengkokpam, S., 2007. Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), juveniles. J. World Aquacult. Soc. 38 (2), 238 – 249.

Biswas, G., Korenaga, H., Nagamine, R., Kono, T., Shimokawa, H., Itami, T., Sakai, M., 2012. Immune stimulant effects of a nucleotide-rich baker's yeast extract in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Aquaculture. 366-367, 40 – 45.

Boyd, C.E., Gautier, D., 2000. Effluent composition and water quality standards. Glob. Aquac. Advocate, 3, 61–66.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem. 72, 248 – 254.

Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L., 2008. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. Fish Shell. Immunol. 28(4), 622 – 631.

Chang, J., Zhang, W., Mai, K., Ma, H., Liufu, Z., Wang, X., Xu, W., 2011. Effects of dietary β -glucan and glycyrrhizin on non-specific immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*

- (Boone) challenged with *Vibrio alginolyticus*. *Aquac. Res.* 42(8), 1101 – 1109.
- Cheng, W., Liu, C.H., Kuo, C.M., Chen, J.C., 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shell. Immunol.* 18(1), 1 – 12.
- Davis, D.A., Lawrence, A.L., Gatlin III, D.M., 1993. Response of *Penaeus monodon* to dietary calcium, phosphorus and calcium:phosphorus ratio. *J. World Aquacult. Soc.* 24, 504-515.
- De Silva, S.S., 2012. Aquaculture: a newly emergent food production sector—and perspectives of its impacts on biodiversity and conservation. *Biodivers. Conserv.* 21(12), 3187 – 3220.
- Defoirdt, T., Halet, D., Sorgeloos, P., Bossier, P., Verstraete, W., 2006. Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Aquaculture.* 261, 804–808.
- Defoirdt, T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Wiele, T.V., Sorgeloos, P., Bossier, P., Verstraete, W., 2007. The bacterial storage compound poly-b-hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environ. Microbiol.* 9(2), 445 – 452.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., 2009. Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnol. Adv.* 27, 680 – 685.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.* 14(3), 251 – 258.
- Hernández, A.J., Satoh, S., Kiron, V., 2012. Supplementation of citric acid and amino acid chelated trace elements in low-fish meal diet for rainbow trout affect growth and phosphorus utilization. *J. World Aquacult. Soc.* 43, 688-696.
- Hossain, M.A., Pandey, A., Satoh, S., 2007. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sci.* 73, 1309 – 1317.
- Hsieh, S.L., Ruan, Y.H., Li, Y.C., Hsieh, P.S., Hu, C.H., Kuo, C. M., 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp

(*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*. 275(1), 335 – 341.

Khajepour, F., Hosseini, S.A, 2012. Calcium and phosphorus status in juvenile beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. *Aquac. Res.* 43(3), 407–411.

Kongnum, K., Hongpattarakere, T., 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish Shell. Immunol.* 32(1), 170 – 177.

Kühlmann, K.J., Jintasataporn, O., Lückstädt, C., 2011. Dietary potassium-diformate (KDF) improves growth performance of white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* under controlled conditions. *International Aquafeed*, March-April, 19-22.

Li, C.C., Yeh, S.T., Chen, J.C., 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish Shell. Immunol.* 25(6), 853 – 860.

Liu, C.H., Yeh, S.P., Kuo, C. ., Cheng, W., Chou, C.H., 2006. The effect of sodium alginate on the immune response of tiger shrimp via dietary administration: activity and gene transcription. *Fish Shell. Immunol.* 21(4), 442 – 452.

Liu, Y., Schryver, P., Van Delsen, B., Maignien, L., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., Defoirdt, T., 2010. PHB-degrading bacteria isolated from the gastrointestinal tract of aquatic animals as protective actors against luminescent vibriosis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 196 – 204.

Lückstädt, C., 2006. Acidifiers in aquaculture prove beneficial. *Feed Mi* 14 (3), 11 – 12.

Lückstädt, C., 2007. The use of acidifiers in fisheries and aquaculture, in: Lückstädt, C. (Ed). *Acidifiers in Animal Nutrition: A Guide to Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance*. Nottingham University Press, United Kingdom, pp. 71 – 79.

Lückstädt, C., 2008. The use of acidifiers in fish nutrition. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. Nutr. and Nat. Resour.* 3 (044), 1–8.

Magallón-Barajas, F., 2013. Personal Communication.

- Maggioni, D.G., Andreatta, E.R., Hermes, E.M., Barracco, M.A., 2004. 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 immunostimulation. *Aquaculture*. 241 501 – 515.
- Mine, S., Boopathy, R., 2011. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *Curr. Microbiol.* 63(1), 1 – 7.
- Morken, T., Kraugerud, O.F., Barrows, F.T., Sørensen, M., Storebakken, T., Øverland, M., 2011. Sodium diformate and extrusion temperature affects nutrient digestibility and physical quality of diets with fish meal and barley protein concentrate for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 317 (1-4), 138-145.
- Ng, W-K., Koh, C.-B., 2011. Application of organic acids in aquafeeds: impacts on fish growth, nutrient utilisation and disease resistance. In: Lückstädt, C. (Ed.), *Standards for Acidifiers, Principles for the Use of Organic Acids in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom, pp. 49–58.
- Nhan, T.D., Wille, M., Schryver, P., Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., 2010. The effect of poly β -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. 302, 76 – 81.
- N.R.C. (Nutrients Requirements of Fish and Shrimp), 2011. Committee on the Nutrient Requirements of fish and Shrimp, National Council of the National Academies, Washington, USA, p. 376.
- Nuez-Ortin, W.G., 2011. Gustor-Aqua: An effective solution to optimize health status and nutrient utilization. *International Aquafeed* May-June, 18-20.
- Obaldo, L.G., Divakaran, S., Tacon, A.G., 2002. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water. *Aquac. Res.* 33, 369 – 377.
- Rosa, R. D., Barracco, M. A., 2010. Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebr. Surviv. J.* 7, 262 – 284.
- Sarker, S.A., Satoh, S., Kiron, V., 2005. Supplementation of citric acid and amino acid-chelated trace element to develop environment-friendly feed for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*. 248, 3– 11.

Sarker, M.S.A., Satoh, S., Kamata, K., Haga, Y., Yamamoto, Y., 2012a. Partial replacement of fish meal with plant protein sources using organic acids to practical diets for juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquacult. Nutr.* 18(1), 81-89.

Sarker, M.S.A., Satoh, S., Kamata, K., Haga, Y., Yamamoto, Y., 2012b. Supplementation effect(s) of organic acids and/or lipid to plant protein-based diets on juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck et Schlegel 1845, growth and, nitrogen and phosphorus excretion. *Aquac. Res.* 43, 538–545.

Schryver, P., Sinha, A.K., Kunwar, P.S., Baruah, K., Verstraete, W., Boon, N., Boeck, G., Bossier, P., 2010. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1535 – 1541.

Silva, B.C., Martins, M.L., Jatobá, A., Buglione-Neto, C.C., Vieira, F.N., Pereira, G.V., Mouriño, J.L.P., 2009. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesqui. Vet. Brasil.* 29(11), 874 – 880.

Silva, B.C., Vieira, F.D.N., Mouriño, J.L.P., Ferreira, G.S., Seiffert, W.Q., 2013. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture.* 384-387, 104 – 110.

Söderhäll, K., Häll, L., 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochim. Biophys. Acta.* 797, 99 – 104.

Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G., Ramsing, N., 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified Fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number count and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microb.* 62, 1405 – 1416.

Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohney, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K., Lightner, D. V., 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 105, 45 – 55.

Vazquez, J.A., Gonzalez, M.P., Murado, M.A., 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*. 245, 149 – 161.

Vieira, F.N., Pedrotti, F.S., Buglione-Neto, C.C., Mouriño, J.L.P., Beltrame, E., Martins, M.L., Arana, L.A.V., 2007. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Braz. J. Oceanogr.* 55(4), 251 – 255.

Vieira, F.N., Buglione-Neto, C.C., Mouriño, J.L.P., Jatobá, A., Ramirez, C., Martins, M.L., Vinatea, L.A., 2008. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 43(6), 763 – 769.

Vieira, F.N., Buglione-Neto, C.C., Mouriño, J.P.L., Jatobá, A., Martins, M.L., Schleder, D.D., Vinatea, L.A., 2010. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* 62(3), 631 – 638.

CAPÍTULO IV

Suplementação dietética de butirato de sódio e polihidroxibutirato no desempenho do camarão branco do Pacífico em sistema de bioflocos

Bruno Corrêa da Silva^{1,2,*}, Felipe do Nascimento Vieira¹, José Luiz Pedreira Mouriño¹, Adolfo Jatobá^{1,3}, Delano Dias Schleder³, Walter Quadros Seiffert¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos. ² Bolsista Capes (PDSE 3892-13-1). ³ Instituto Federal Catarinense (IFC), Campus Araquari. *bcs85@hotmail.com.

*Artigo formatado de acordo com as normas da revista “Aquaculture” (A2, Fator de impacto: 2,009).

21 RESUMO

Ácido butírico ou seus derivados podem promover a melhoria na eficiência da utilização de nutrientes, alteração da microbiota intestinal e aumento da imunidade em animais terrestres e aquáticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de dietas suplementadas com butirato de sódio ou polihidroxibutirato (PHB) sobre os parâmetros zootécnicos, alteração da microbiota intestinal e parâmetros hemato-imunológicos do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) cultivados em sistema superintensivo de bioflocos. Foram utilizados doze tanques de 800 L povoados com 250 camarões·m⁻³ (3,96 ± 0,04 g) em sistema de bioflocos. A dieta foi suplementada ou não com 2% de cada aditivo alimentar. Após seis semanas de cultivo, doze animais de cada tanque foram transferidos para aquários de 40 L e desafiados com 1 x 10⁵ unidades formadoras de colônias de *Vibrio* sp. Foi observada maior sobrevivência (p=0,042) e produtividade (p=0,042), assim como, menor contagem de bactérias totais (p=0,019) e vibrios no intestino (p=0,038) em camarões alimentados com dieta suplementada com butirato em relação aos camarões que receberam a dieta controle ao longo do ensaio de crescimento. Contudo não foi observada diferença (p>0,05) nos demais parâmetros zootécnicos avaliados. Os camarões alimentados com dietas suplementadas com butirato de sódio e PHB apresentaram, antes e após o desafio experimental, aumento na contagem de hemócitos totais (p=0,001) e granulares (p=0,001), além de aumento no título de aglutinação do soro (p=0,001). Os camarões alimentados com dietas contendo butirato de sódio também apresentaram maior contagem de células hialinas antes do desafio (p=0,002). Porém, não foram observadas alterações na atividade da fenoloxidase (PO), antes ou após o desafio, entre os camarões alimentados com as diferentes dietas (p>0,05), nem diferenças significativas na mortalidade acumulada após infecção com *Vibrio* sp. (p>0,05). Com isso, conclui-se que a suplementação dietética do PHB e, principalmente do butirato de sódio, para *L. vannamei* cultivados em sistema superintensivo de bioflocos, teve efeito na modulação do sistema imunológico, além de diminuir a concentração de bactérias patogênicas no intestino, aumentando assim a sobrevivência, e consequentemente, a produtividade do cultivo.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, sistema heterotrófico, aditivos alimentares, ácidos orgânicos, microbiota intestinal, parâmetros imunológicos.

22 ABSTRACT

Butyric acid and derivatives can enhance nutrient utilization, changes in the intestinal microbiota, and increased immunity in terrestrial and aquatic animals. The aim of this study was to evaluate the effect of dietary supplementation with sodium butyrate or polyhydroxybutyrate (PHB) in the growth performance and in changes of intestinal microbiota and hemato-immunological parameters of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) grown under a superintensive biofloc system. Twelve tanks of 800 L were stocked with 250 shrimp·m⁻³ (3.96 ± 0.04 g) in biofloc system. The diets were supplemented with 2% of each feed additive. After six weeks, twelve shrimp from each tank were transferred to 40 L aquariums and 1 x 10⁵ colony forming units of *Vibrio* sp. Higher survival (p=0,042) and productivity (p=0,042), even as lower total bacterial (p=0,019) and vibrios counts (p=0,038) in shrimp intestine, were observed in the tanks fed with butyrate supplemented diet compared to control shrimps. However, no differences were observed in the other performance parameters analyzed (p>0,05). Shrimp fed diets supplemented with sodium butyrate and PHB, before and after the experimental challenge, showed an increase of total and granular hemocytes (p=0,001), in addition to an increase in serum agglutination titre (p=0,001). Shrimp fed diets containing sodium butyrate also had higher counts hyaline cells before challenge (p=0,002). However, changes in the phenoloxidase (PO) activity were not observed before or after the challenge among shrimp fed different diets (p>0,05). Also no significant differences in cumulative shrimp mortality after infection with *Vibrio* sp. were observed (p>0,05). Thus, we can conclude that dietary supplementation of PHB, and mainly sodium butyrate, for *L. vannamei* grown in superintensive biofloc system, acted as an immune system modulator reducing pathogenic bacteria concentration in the shrimp gut, thereby increasing survival and productivity in the culture of shrimp in biofloc systems.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; heterotrophic system; feed additives; organic acids; intestinal microbiota; immunological parameters.

23 INTRODUÇÃO

O maior entrave para o crescimento da carcinicultura são as enfermidades, destacando-se as de origem virais, como o vírus da mancha branca (WSSV), vírus de Taura (TSV), vírus da cabeça amarela (YHV) e vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) (Lightner, 2005). Contudo, primeiramente relatada em 2009, a AHPNS na Ásia (do inglês, *Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome*), causada pelo *Vibrio parahaemolyticus* é hoje a enfermidade responsável pelas maiores perdas para a carcinicultura marinha (Tran et al., 2013).

Para o controle destas enfermidades, a utilização profilática de antibióticos é a estratégia mais utilizada na carcinicultura (Skjermo e Vadstein, 1999). Porém, o uso massivo de antibióticos tende a selecionar cepas de bactérias resistentes (Holmström et al., 2003). Além disso, a presença de resíduo de antibióticos no tecido do camarão inviabiliza a comercialização para muitos países e prejudica a saúde do consumidor (Cabello, 2006). Neste contexto, pesquisas com uso de sistemas de cultivo mais biosseguros, como o sistema de bioflocos (Wasielesky et al., 2006) e métodos preventivos alternativos de combate a enfermidades são fundamentais, como a inclusão dietética de ácidos orgânicos e seus sais (Lückstädt, 2008; Defoirdt et al., 2011).

O cultivo em meio bioflocos favorece a formação de agregados microbianos com uma mistura complexa (Bratvold e Browdy, 2001); compostos por bactérias, algas, fungos, protozoários, rotíferos, nematóides, entre outros; resultantes da conversão de detritos orgânicos. Estes agregados são consumidos regularmente pelos camarões durante o cultivo (Cuzon et al., 2004, Wasielesky et al., 2006). Além de proteína, os flocos contêm quantidades importantes de macronutrientes (cálcio, fósforo, potássio e magnésio) e micronutrientes (cobre, ferro, manganês e zinco), assim como aminoácidos e ácidos graxos essenciais (Moss et al., 2006). O consumo deste bioflocos contribui duplamente para a dinâmica do cultivo, pois além de constituir uma fonte para a nutrição dos camarões é um eficiente instrumento de reciclagem dos nutrientes (Mcintosh, 2001).

Já os ácidos orgânicos e seus sais exercem efeitos sobre o desempenho zootécnico dos animais durante os cultivos através de mecanismos distintos, como inibição de patógenos, melhoria da absorção de macro e micronutrientes, além de fornecer energia altamente disponível (Lückstädt, 2008).

Pesquisas com a utilização de ácido butírico ou butirato de sódio em animais terrestres e humanos têm ganhado destaque nos últimos

anos. Na revisão de Hamer et al. (2008) sobre a função do butirato na saúde do colón intestinal de humanos, é citado que ele possui efeitos na inibição da carcinogênese do cólon, efeito anti-inflamatório, capacidade de inibição do estresse oxidativo, além de aumentar as barreiras de defesa do intestino e a saciedade. Em suínos e frangos de corte a suplementação dietética do butirato de sódio apresenta melhorias no ganho de peso, na imunologia e na saúde intestinal (Galfi; Bokori, 1990; Adil et al., 2010, 2011; Zhang et al., 2011).

No cultivo de peixes, alguns estudos sugerem melhorias no ganho de peso e conversão alimentar com uso de butirato de sódio, como em bagre africano (*Clarias gariepinus*) (Owen et al., 2006), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), carpa comum (*Cyprinus carp*) (Zheng, 2009) e dourada (*Sparus aurata*) (Robles et al., 2013). Porém, não apresentou resultados positivos para salmonídeos (Bjerkeng et al., 1999; Gao et al., 2011).

Em camarões marinhos, o uso da suplementação de produto comercial composto por 30-40% de butirato de sódio protegido com óleos vegetais, melhorou o desempenho no cultivo de *Penaeus monodon* (Nuez-Ortin, 2011a). Silva et al. (2013a) observaram que o butirato de sódio possui potencial inibitório contra cepas de *Vibrio* patogênicas para camarões marinhos e sua suplementação em dietas comerciais aumenta a atratividade e consumo do *Litopenaeus vannamei*. Além disso, esses mesmos autores observaram melhorias em parâmetros zootécnicos em ensaio de crescimento em água clara de *L. vannamei* suplementado com 0,5% a 2% de butirato de sódio (Silva et al., 2013b).

Contudo, o butirato de sódio possui alta solubilidade em água, havendo grande lixiviação na ração, necessitando assim de grandes quantidades para manter sua eficiência (Defoirdt et al., 2011). Com isso, surgem trabalhos testando polímeros hidrofóbicos, como o polihidroxibutirato (PHB, polímero biodegradáveis de ácido butírico). O uso de PHB apresentou bons resultados quando aplicado na água para artêmia (*Artemia franciscana*) (Defoirdt et al., 2007), via artêmia para camarão gigante da Malásia (*Macrobrachium rosenbergii*) (Nhan et al., 2010), e suplementado em dieta para robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) (Schryver et al., 2010).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de dieta suplementada com butirato de sódio e PHB nos parâmetros zootécnicos, na contagem bacteriana intestinal e nos parâmetros hematológicos do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*)

em sistema de bioflocos, além da sobrevivência destes após o desafio experimental com *Vibrio* sp.

MATERIAL E MÉTODOS

A preparação das dietas experimentais foi realizada no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará. A engorda experimental foi realizada no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) e o desafio experimental no Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS), ambos pertencentes à Universidade Federal de Santa Catarina.

24.1 Material biológico

Os camarões *Litopenaeus vannamei* foram provenientes de uma linhagem livre de patógenos específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*) de notificação obrigatória (WSSV, IHNV, TSV, IMNV e YHV), pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) oriundos da Aquatec Ltda. Os camarões foram cultivados no LCM em sistema intensivo fechado com bioflocos bacterianos até o início do experimento.

24.2 Preparação e análise das dietas

As dietas experimentais utilizadas nos ensaios foram formuladas contendo 320 g kg⁻¹ de proteína bruta, sem a inclusão de farinha de peixe (Tabela 14). Os ingredientes secos da dieta foram previamente moídos e peneirados (300 µm), posteriormente os microingredientes foram homogeneizados em misturador Y por 10 min e adicionados aos macroingredientes para homogeneização em um misturador de alimentos por mais 10 min. Logo após, foram adicionados os óleo de peixe, óleo de soja, a lecitina de soja e 30% de água. A mistura resultante foi extrusada a 90 °C em micro-estrusora com capacidade de 40 kg.h⁻¹ (modelo EX30, EXTEEC Máquinas, São Paulo, Brasil). O butirato de sódio (Sigma-Aldrich, MO-USA) e o PHB (Biocycle® 1000, Biocycle, Brasil) foram adicionados substituindo o caulim, utilizado como ingrediente de preenchimento. A composição centesimal foi realizada conforme a metodologia descrita pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*, 2005) (Tabela 14).

24.3 Ensaio de crescimento

Doze unidades experimentais de polietileno com 800 L de água (raio = 0,65 m) foram abastecidas através do bombeamento da água do tanque matriz cultivado em sistema de bioflocos. Os parâmetros de

qualidade de água do tanque matriz no dia do início do experimento são mostrados na Tabela 15. As unidades continham 4 m² de superfície (fundo e lateral) e mais 2 m² oferecido em substrato artificial para aumentar o conforto dos animais (Schveitzer et al., 2013a). Aeração constante foi provida através de mangueiras de difusão ligadas a um soprador de ar do tipo *blower* de 7,5 CV e aquecedores de titânio (800 watts de potência) com termostato, mantendo a temperatura em $29 \pm 0,5$ °C.

As unidades experimentais foram distribuídas completamente ao acaso em um tratamento onde os camarões foram alimentados com a dieta suplementada com butirato de sódio, PHB e um controle (sem suplementação), em quadruplicata. Cada tanque foi povoado com 200 camarões com peso médio de $3,96 \pm 0,04$ g, mantendo uma densidade inicial de 250 camarões·m⁻³.

Os camarões foram alimentados quatro vezes ao dia (8:00; 11:00; 14:00 e 17:00), e a alimentação controlada através do consumo. A dieta foi oferecida a lanço (90%) e em bandejas de alimentação (10%), duas horas após serem ofertadas as bandejas eram checadas para estimar o consumo da dieta no tanque.

Durante o experimento, o oxigênio dissolvido e temperatura foram mensurados duas vezes ao dia (YSI, modelo Pro 20). Duas vezes por semana foram realizadas análises de pH (YSI, modelo Professional Plus), salinidade (salinômetro digital YSI 30), transparência (disco de secchi), volume de sólidos suspensos (cone Imhoff) nitrogênio amoniacal total, nitrito, alcalinidade e sólidos totais (APHA, 2005). Uma vez por semana foi realizado a quantificação de sólidos fixos, sólidos voláteis, nitrato, clorofila-a (APHA, 2005) e ortofosfato dissolvido (Strickland e Parsons, 1972).

Os sólidos totais foram mantidos entre 400 e 600 mg.L⁻¹ (Schveitzer et al., 2013b) e, quando este valor era ultrapassado o excedente era retirado com o auxílio de decantadores com capacidade de 15 L para retirada de sólidos dos tanques (Ray et al., 2010).

Ao longo do cultivo não houve renovação de água, sendo repostos apenas o volume evaporado com água doce. Foi utilizado melaço de cana nas quatro primeiras semanas do experimento mantendo uma relação de 15:1 de carbono nitrogênio com a dieta. O melaço era fornecido duas vezes ao dia entre as alimentações. Também foi utilizada cal hidratada quando a alcalinidade apresentou valores menores que 120 mg.L⁻¹ CaCO₃, a dose foi 10% (p/p) da entrada diária de alimento.

Tabela 14 - Formulação e composição centesimal das dietas experimentais utilizados na engorda experimental de *Litopenaeus vannamei* em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB).

Ingredientes (g kg⁻¹)	Controle	Butirato	PHB
Concentrado proteico de soja (630 g.kg ⁻¹ PB)	171,6	171,6	171,6
Farelo de soja (450 g kg ⁻¹ PB)	350,0	350,0	350,0
Farinha de trigo	250,0	250,0	250,0
Quirera de arroz	80,0	80,0	80,0
Óleo peixe	25,1	25,1	25,1
Óleo de soja	20,4	20,4	20,4
Lectina de soja	15,0	15,0	15,0
Fosfato monobalcico	20,0	20,0	20,0
Sal comum	15,0	15,0	15,0
Cloreto de potássio	3,0	3,0	3,0
Sulfato de magnésio	8,0	8,0	8,0
Caulim	31,6	11,6	11,6
Butirato de sódio (98%)	0,0	20,0	0,0
PHB (98%)	0,0	0,0	20,0
¹ Premix vitamínico-mineral ¹	10,0	10,0	10,0
Vitamina-C ²	0,3	0,3	0,3
Composição centesimal (g kg⁻¹)	Controle	Butirato	PHB
Umidade	101,9	86,6	103,8
Proteína bruta	314,0	323,4	311,2
Extrato etéreo	65,4	64,0	64,9
Extrato não nitrogenado	386,8	397,7	390,1
Material mineral	104,0	98,4	87,2
Fibra bruta	27,9	29,8	42,8
Energia ³	4002	4084	4095

¹ -Níveis de garantia por quilo do produto: vit. A - 1.250.000 UI; vit. D₃ - 350.000 UI; vit. E - 25.000 UI; vit. K₃ - 500 mg; vit. B₁ - 5.000 g; vit B₂ 4.000 g; vit. B₆ - 5.000 g; B₁₂ - 10 mg; ácido nicotínico - 15.000 mg; ácido pantotênico - 10.000 mg; biotina - 150 mg; ácido fólico - 1,25 mg; vit. C - 25.000 mg; Colina - 50.000 mg; Inositol 30.000 mg; Ferro - 2.000 mg; Cobre - 3.500 mg; Cobre-quelado - 1.500 mg; Zinco - 10.500 mg; Zinco-quelado - 4.500 mg; Manganês - 4.000 mg; Selênio - 15 mg; Selênio-quelado - 15 mg; Iodo - 150 mg; Cromo - 80 mg e Veículo (q.s.p). ² - Vitamina-C: Rovimix Stay-C® 35%, DSM Produtos Nutricionais Brasil (São Paulo, Brasil). Ácido L-ascórbico-2-monofosfato. ³ - cal.g⁻¹.

24.4 Avaliação dos parâmetros zootécnicos

Após 42 dias de cultivo foi realizada uma biometria final de todos os camarões de cada unidade experimental para obtenção dos parâmetros zootécnicos, como: peso final, ganho de peso semanal, produtividade, eficiência alimentar e sobrevivência.

Ao final do cultivo também foram coletados 10 camarões por unidade experimental para posteriormente análise e cálculo da retenção de nitrogênio e fósforo e a taxa de eficiência proteica.

$$\text{Retenção (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Bf} \times \text{NCf}) - (\text{Bi} \times \text{NCi})}{\text{Ingestão total do Nutriente}}$$

Onde, Bf – Biomassa final, NCf – % Nutriente (nitrogênio ou fósforo) corporal final, Bi – Biomassa inicial, Nci - % Nutriente (nitrogênio ou fósforo) corporal inicial.

$$\text{Taxa de eficiência proteica (TEP)} = \frac{\text{Ganho de peso (g)}}{\text{Consumo total de proteína (g)}}$$

24.5 Contagem bacteriológica

Após 40 dias de cultivo, cinco camarões de cada unidade experimental foram amostrados para a formação de um *pool* por unidade, além de 10 mL da água de cada tanque, para realizar a contagem bacteriológica. Os intestinos dos camarões foram extirpados com auxílio de pinças e bisturi, homogeneizados em solução salina estéril a 3% de NaCl em um graal. Em seguida, as amostras, tanto de água como de intestino, foram diluídas serialmente (1/10) em solução salina estéril 3,0%, semeadas em meio de cultura Agar Marine (para bactérias marinhas heterotróficas totais) e Agar de Tiosulfato, Citrato, Bile e Sacarose (TCBS, meio seletivo para vibrios), e incubadas em estufa a 29 °C durante 24 h.

24.6 Desafio experimental

Para realização dos desafios experimentais foi utilizado uma cepa de *Vibrio* sp. (CPQBA 378-12 DRM01) isolada da hemolinfa de camarões *L. vannamei* reprodutores mantidos no setor de maturação do LCM, sintomáticos com melanização cutânea, durante um surto de mortalidade. A cepa foi identificada através do sequenciamento de fragmentos do gene RNA ribossomal 16S como *Vibrio* sp. (dados não publicados), apresentando alta similaridade na análise filogenética com as cepas de *Vibrio natriegens* e *Vibrio alginolyticus* (Figura 7).

Para o desafio experimental utilizou-se a dose letal 10 (DL₁₀) de 1 x 10⁵ unidades formadoras de colônia (UFC) por camarão,

determinada para esta cepa por ensaios anteriores com camarões com peso de $11,5 \pm 1,2$ g crescidos em água clara e mantidos em aquários a 28 °C. Neste ensaio os camarões estabilizaram sua mortalidade 54 h após a infecção (dados não publicados).

No desafio experimental 12 camarões de cada unidade experimental foram transferidos para 12 aquários de 40 L contendo aquecimento (28 °C) e aeração constante, obedecendo ao mesmo delineamento experimental da engorda. O inóculo crescido em caldo de coração e cérebro (BHI, do inglês, *Brain and Heart Infusion*) por 18 h em 28 °C foi centrifugado por 30 min a 1800 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em solução salina estéril 3,0% na proporção para que a suspensão se mantivesse em 1×10^8 UFC·mL⁻¹, segundo a curva de crescimento realizada anteriormente. Posteriormente, a suspensão foi diluída até a concentração desejada para o desafio. Os camarões foram injetados com 100 µL da suspensão na parte dorsal do primeiro segmento abdominal. A mortalidade foi acompanhada até 96 h após o desafio.

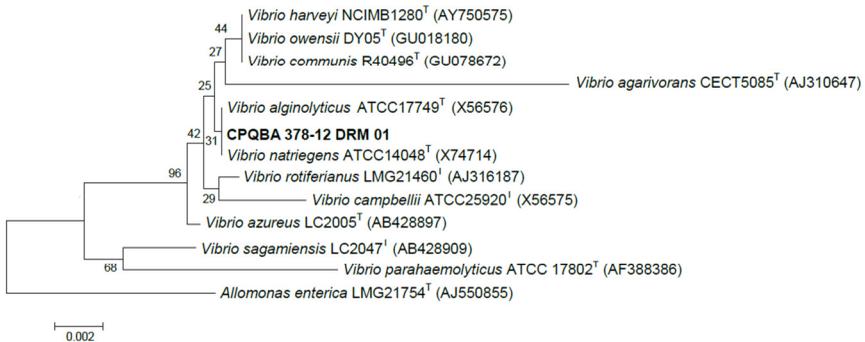


Figura 7 – Árvore filogenética demonstrando as relações evolutivas entre as sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S da cepa de *Vibrio* isolado de hemolinfa de camarões em surto de mortalidade e utilizado nos desafios experimentais (CPQBA 378-12-DRM 01) e sequências de linhagens de microrganismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e GenBank.

24.7 Análises hemato-imunológicas

Antes do desafio experimental a hemolinfa de dez animais por unidade experimental foi coletada para formar dois *pools*, enquanto que após o desafio foi coletada a hemolinfa de cinco animais por unidade

experimental (um *pool*). As amostras foram coletadas com seringas estéreis de 1 mL de agulha 21G resfriadas a 4 °C. Da hemolinfa coletada de cada animal, 40 µL foram fixado em solução de 4% de formaldeído/MAS (citrato de sódio 27 mM, EDTA 9 mM, glicose 115 mM, NaCl 336 mM, pH 7,0) para contagem total de hemócitos (THC), e o restante foi deixado coagular a 4 °C. A hemolinfa coagulada foi congelada a -20 °C e centrifugada repetidamente a 10.000 g por 10 min a 4 °C para obtenção do soro, e este aliqotado e estocado a -20 °C para uso posterior nas demais análises imunológicas.

O número total e diferencial de hemócitos por mililitros de hemolinfa foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer com microscopia de contraste de fase.

Para determinar o título aglutinante, as amostras de 50 µL de soro foram diluídas serialmente em TBS-1 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7.4) em placas de 96 micropoços com fundo côncavo. Depois, cada poço recebeu 50 µL de solução 2% de eritrócitos de cachorro em solução TBS-1 e incubados por 3 h a 25 °C em câmara úmida. O controle foi realizado substituindo o soro por TBS-1. O título aglutinante foi definido como o recíproco da maior diluição capaz de aglutinar os eritrócitos (segundo Maggioni et al, 2004).

A atividade da fenoloxidase (PO) foi determinada no soro por espectrofotometria (DO_{490nm}) pela formação do pigmento DOPA-cromo, após a oxidação do substrato L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), através da metodologia descrita por Söderhäll e Häll (1984). Primeiramente, amostras do soro (2 *pools* de 5 animais por tratamento) foram diluídos (1:8) em TBS-2 (1 mM Tris, 336 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 7.6). Desta solução, 50 µL foi incubada em um volume igual de tripsina (1 mg·mL⁻¹) por 15 min à 20 °C em placas de 96 micropoços. Após a incubação, 50 µL de solução L-DOPA (3 mg·L⁻¹) foi adicionado a cada poço. O controle foi feito com 50 µL de TBS-2 em substituição da tripsina. A formação do DOPA-cromo foi monitorada nos tempos 0, 5, 15 e 20 min depois da adição da solução L-DOPA. Uma unidade de atividade específica da PO foi equivalente à variação de 0,001 na absorbância·min⁻¹·miligramma de proteína⁻¹. A concentração de proteína na hemolinfa foi estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro-albumina bovina como padrão.

24.8 Análises dos dados

Antes de serem submetidos às análises estatísticas os dados de contagem bacteriológica foram transformados em log₁₀ (x+1), os dados

do título de aglutinação foram transformados em $\log_2(x+1)$, e os dados de sobrevivência do cultivo e do desafio experimental foram transformados em arco-seno (x). A homocedasticidade dos dados foi avaliada pelo teste de Bartlett, e posteriormente os dados zootécnicos, de retenção de nitrogênio e fósforo, taxa de eficiência proteica, contagem bacteriológica, hemato-imunológicos e de mortalidade após o desafio foram submetidos à análise de variância unifatorial. Os dados dos parâmetros de qualidade de água foram analisados por análise de variância com parcela subdividida no tempo. Caso necessário à realização da separação de médias, esta foi realizada pelo teste de Student Newman Keuls (SNK). Todos os testes estatísticos foram avaliados com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

25.1 Parâmetros de qualidade de água

As médias e valores máximos e mínimos dos parâmetros de qualidade de água encontrados ao longo das seis semanas de cultivo estão representados na Tabela 15. Os parâmetros analisados não apresentaram diferenças significativas entre os tanques que receberam diferentes alimentos. Também não foram observadas variações significativas entre os parâmetros ao longo das semanas, com exceção da alcalinidade e nitrato. A alcalinidade dos tanques de cultivo apresentava valores médios de 140 a 150 mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ até a quarta semana, baixando para 90 mg $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ no início da quinta semana, após a retirada do melaço. Contudo a alcalinidade foi corrigida rapidamente com a utilização de cal hidratada. Nessa ocasião o pH dos tanques não sofreu tanta alteração, baixando de 7,6 para 7,3, em média. Essa redução é explicada pela ação das bactérias nitrificantes que utilizam carbonatos como fonte de carbono, mantendo os níveis de amônia e nitrito baixo (Ebiling et al., 2006). Já a concentração do nitrato iniciou com 36,58 mg $\text{N-NO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, aumentou até o final da segunda semana de cultivo, chegando a uma média de 82,26 mg $\text{N-NO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Todavia, a partir da terceira semana até o final do cultivo se manteve em 30 mg $\text{N-NO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, em média. Essa baixa pode ser explicada pela estabilização de uma comunidade de bactérias desnitrificantes no tanque (Hamlin et al., 2008). Apesar das variações, todos os parâmetros de qualidade de água analisados se mantiveram dentro de padrões aceitáveis para camarões marinhos (Boyd e Gautier, 2010).

Tabela 15 – Parâmetros de qualidade de água na engorda experimental de *Litopenaeus vannamei* em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB).

Parâmetros qualidade de água	Tanque Matriz	Controle	Butirato	PHB
Temperatura (°C)	27,0	29,1 (28,5-30,8)	29,1 (27,9-30,7)	29,2 (28,1-31,1)
Salinidade (ppt)	37,5	35,3 (31,9-38,4)	35,9 (33,1-38,4)	35,6 (33,6-38,5)
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	5,6	5,3 (4,3-6,5)	5,3 (3,5-5,9)	5,3 (4,0-6,3)
pH	7,42	7,54 (7,15-7,87)	7,64 (7,43-7,98)	7,58 (7,32-7,93)
NAT (mg.L ⁻¹)	0,21	0,18 (0,06-0,68)	0,16 (0,01-0,35)	0,17 (0,05-0,62)
N-NO ₂ (mg.L ⁻¹)	0,93	0,57 (0,18-1,02)	0,56 (0,17-1,00)	0,54 (0,15-0,90)
N-NO ₃ (mg.L ⁻¹)	36,58	55,2 (25,1-130,2)	58,8 (25,1-137,2)	57,3 (21,6-124,8)
P-PO ₄ (mg.L ⁻¹)	0,56	0,70 (0,43-0,92)	0,78 (0,50-1,16)	0,68 (0,40-0,92)
Clorofila-a (µg.L ⁻¹)	94,7	83,3 (72,5-94,9)	69,6 (65,8-77,0)	81,8 (64,6-104,4)
Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	152	131 (72-185)	144 (88-190)	139 (85-185)
Transparência(cm)	15	13 (6-18)	13 (10-18)	13 (6-17)
Volume de sólidos sedimentáveis (mL)	6	8 (4-14)	9 (4-21)	8 (3-15)
Sólidos totais (mg.L ⁻¹)	434	542 (425-712)	562 (376-719)	548 (428-738)
Sólidos voláteis (%)	39	44 (38-53)	44 (31-50)	45 (37-53)

NAT – Nitrogênio amoniacal total.

25.2 Parâmetros zootécnicos

A produtividade e sobrevivência nos tanques onde os camarões foram alimentados com dieta suplementada com butirato de sódio foram superiores em relação ao controle (Tabela 16). Porém não foram observadas diferenças nos demais parâmetros zootécnicos avaliados.

Todavia, um estudo de crescimento de *L. vannamei* em bioflocos utilizando dietas com ingredientes proteicos de origem vegetal, assim como nesse estudo, apresentaram ganhos de peso semanal de 0,66 a 0,89 g·semana⁻¹ (Ray et al., 2010). Já outros ensaios de crescimento de *L. vannamei* em sistema superintensivos de bioflocos utilizando dietas comerciais, apresentaram dados de ganho de peso semanal entre 0,44 a 0,75 g·semana⁻¹ (Schveitzer et al., 2013a, 2013b), enquanto este estudo mostrou ganho de peso semanal superior a 1,5 g·semana⁻¹ para os camarões alimentados com todas as dietas experimentais.

Tabela 16 – Parâmetros zootécnicos na engorda experimental de *Litopenaeus vannamei* em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB).

	Controle	Butirato	PHB
Peso final (g)	13,28±0,29	13,29±0,45	13,00±0,26
Ganho de peso (g semana⁻¹)	1,55±0,05	1,56±0,08	1,51±0,04
Sobrevivência (%)	76,50±2,94 ^b	81,63±2,84 ^a	79,95±0,50 ^{ab}
Produtividade (kg m⁻³)	2,54±0,15 ^b	2,71±0,04 ^a	2,58±0,05 ^{ab}
Eficiência alimentar	0,45±0,05	0,46±0,02	0,44±0,01

* Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%.

Outros estudos com a suplementação de butirato de sódio em camarões marinhos apresentaram melhorias nos desempenhos zootécnicos. Nuez-Ortiz (2011a) relatou um aumento de 3% na sobrevivência e 9% no ganho de peso de *P. monodon* com a suplementação dietética de 0,1% de um produto comercial a base de butirato de sódio protegido com óleos vegetais. Um estudo realizado pelo nosso grupo também observou o aumento de ganho de peso e taxa de crescimento específico de *L. vannamei* em fase de berçário, realizado em água clara, suplementados com 73 mM de butirato de sódio em dieta comercial (dados não publicados). Contudo nesse estudo, não foi observada diferença na sobrevivência, que se manteve acima de 96%. Em outro estudo de crescimento em água clara, Silva et al. (2013b) observaram que o uso de dieta suplementada com butirato de sódio aumentou o crescimento e a sobrevivência de *L. vannamei*. Em nosso trabalho, usando sistema de bioflocos, o crescimento dos camarões não

foi alterado pelo uso do butirato, demonstrando que os aditivos alimentares podem ter efeitos diferentes nos animais dependendo do sistema de cultivo em que são avaliados.

Em dourada (*S. Aurata*) a suplementação de 0,3% do butirato de sódio protegido também aumentou o ganho de peso (Robles et al., 2013). Outros estudos com PHB também mostraram melhorias zootécnicas no cultivo de animais aquáticos. O enriquecimento de artêmia com PHB aumentou a sobrevivência e o desenvolvimento larval do camarão de água doce, *M. rosenbergii* (Nhan et al., 2010). A suplementação dietética de 2% e 5% de PHB melhorou o ganho de peso e a conversão alimentar do robalo europeu (*D. Labrax*) (Schryver et al., 2010).

25.3 Utilização de nitrogênio e fósforo

Neste estudo não foram observadas diferenças significativas na retenção de nitrogênio e fósforo, nem na taxa de eficiência proteica entre os camarões cultivados em bioflocos e alimentados com dietas contendo butirato de sódio e PHB (Tabela 17).

Tabela 17 - Retenção corporal de nitrogênio e fósforo e taxa de utilização de proteína de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB).

	Controle	Butirato	PHB
Retenção de Nitrogênio (%)	54,26±7,41	54,96±1,88	55,07±7,54
Retenção de Fósforo (%)	90,26±8,60	82,89±4,75	85,23±7,13
Taxa de Eficiência Proteica (TEP)	1,60±0,16	1,54±0,08	1,56±0,05

Estudos com bioflocos têm demonstrado a importância desse sistema para reciclagem destes nutrientes e o seu aproveitamento pelos microrganismos que compõe este sistema. Por isso, camarões *L. vannamei* possui maior capacidade de incorporar nitrogênio e fósforo quando cultivado em sistemas superintensivos de bioflocos, pois reaproveitam estes nutrientes quando se alimentam dos flocos microbianos (Silva et al., 2013c). Este fato pode explicar o motivo da suplementação com os derivados de ácido butírico neste estudo não aumentarem a utilização do nitrogênio. Em água clara a suplementação

de 0,5% e 2% de butirato de sódio aumentou a retenção de nitrogênio e a taxa de eficiência proteica, porém não aumentou a retenção de fósforo no cultivo de *L. vannamei* (Silva et al., 2013b).

Em peixes o ácido orgânico mais estudado para aumentar a retenção de nitrogênio ou fósforo é o ácido cítrico, apresentando bons resultados em carpa rohu (*Labeo rohita*) (Baruah et al., 2005, 2007), em pargo vermelho (*Pagrus major*) (Sarker et al., 2005; Hossain et al., 2007), esturjão europeu (*Huso huso*) (Khajepour e Hosseini, 2012) e olhete (*Seriola quinqueradiata*) (Sarker et al., 2012a, 2012b).

25.4 Contagem bacteriológica

A contagem bacteriológica intestinal dos camarões alimentados com as dietas suplementadas com 2% de butirato de sódio apresentou menores valores de bactérias marinhas heterotróficas totais (Agar Marine) e vibrios marinhos (TCBS) (Figura 8). Alguns autores vêm demonstrando *in vitro* o potencial do butirato de sódio em inibir cepas de bactérias patogênicas para peixes e camarões (Nuez-Ortiz, 2011b; Silva et al., 2013a). Em água clara, camarões alimentados com butirato de sódio (0,5-2%) também apresentaram uma menor contagem de vibrios, no entanto não foram observadas diferenças significativas para bactérias marinhas totais (Silva et al., 2013b).

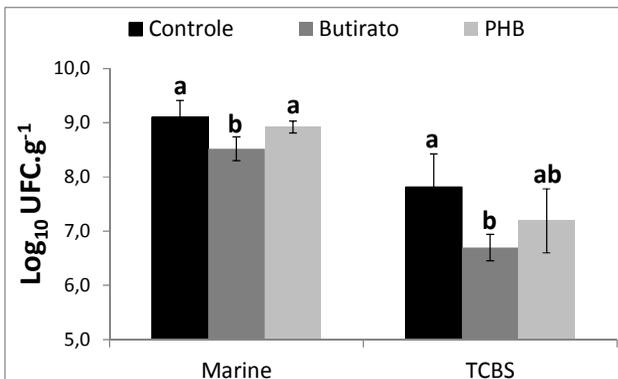


Figura 8 – Contagem bacteriológica do trato intestinal de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%.

Neste estudo a suplementação de 2% de PHB não alterou significativamente a contagem bacteriana intestinal em relação aos

camarões do controle, apesar de haver uma diminuição numérica na concentração de vibrio (Figura 8). Porém, outros estudos mostram que a suplementação de PHB modifica a microbiota de animais aquáticos. No camarão gigante da Malásia (*M. rosenbergii*) a suplementação de PHB via artêmia diminuiu as concentrações de bactérias totais e vibrios nas larvas (Nhan et al., 2010). A suplementação dietética de 2-5% de PHB para robalo europeu (*D. Labrax*) alterou significativamente a comunidade bacteriana intestinal em relação à comunidade dos robalos do tratamento controle, sem suplementação (Schryver et al., 2010).

Todavia, a contagem bacteriológica não apresentou diferenças significativas entre as águas dos tanques que receberam diferentes alimentos. Houve uma tendência da água do cultivo dos camarões alimentados com dietas contendo butirato de sódio e PHB, em média, possuir menor contagem de bactérias marinhas heterotróficas totais e vibrios marinhos, contudo as contagens apresentaram uma grande variação entre os tanques dos mesmos tratamentos. A água dos tanques dos tratamentos controle, com suplementação de butirato e com suplementação de PHB apresentaram, respectivamente, contagens de $3,5 \pm 16,3$; $0,6 \pm 1,1$; $0,6 \pm 0,3 \times 10^6$ UFC·mL⁻¹ de bactérias marinhas heterotróficas totais; e $3,3 \pm 11,1$; $1,7 \pm 1,7$; $0,7 \pm 0,1 \times 10^4$ UFC·mL⁻¹ de vibrios marinhos.

25.5 Parâmetros hemato-imunológicos

Os camarões alimentados com dietas suplementadas com butirato de sódio e PHB apresentaram antes e após o desafio experimental aumento na contagem de hemócitos totais e granulares, além de aumento no título de aglutinação do soro (Tabela 18). Os camarões alimentados com dietas contendo butirato de sódio também apresentaram maior contagem de células hialinas antes do desafio. Não foram observadas alterações na atividade da PO antes ou após o desafio, nos camarões alimentados com as diferentes dietas (Tabela 18).

L. vannamei cultivados em água clara e suplementados com diferentes concentrações de butirato de sódio não apresentaram alterações nas contagens totais de hemócitos e na atividade da PO, no entanto, apresentaram aumento do título de aglutinação do soro (Bolívar et al., 2013). Corroborando com os resultados deste estudo, Anuta et al. (2011) observaram aumento na contagem de hemócitos hialinos e granulares em *L. vannamei* alimentados com dietas suplementadas com a maior dose avaliada (2%) de um ácido inorgânico comercial, com base no sulfato de cálcio.

A atividade da PO apresentou diferentes resultados em diferentes espécies de camarões marinhos suplementados com alginato de sódio (polissacarídeo contendo grupos carboxílicos), enquanto em *L. vannamei* apresentou aumento na atividade da PO após a alimentação com dietas contendo alginato de sódio (Cheng et al., 2005; Yeh et al., 2009), em *P. monodon* não foi observado diferenças significativas (Liu et al, 2006).

Tabela 18 – Parâmetros hemato-imunológicos de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB).

Desafio	Parâmetro hemato-imunológico	Controle	Butirato	PHB
Antes	Total de hemócitos (10^6 cels/mL ⁻¹)	31,59±2,08 ^b	46,02±8,78 ^a	39,15±1,88 ^a
	Granular (10^6 cels/mL ⁻¹)	16,27±2,01 ^b	24,99±3,16 ^a	23,36±1,69 ^a
	Hialino (10^6 cels/mL ⁻¹)	15,32±1,59 ^b	21,27±5,43 ^a	15,80±1,19 ^b
	Aglutinação (\log_2 x+1)	12,00±0,00 ^b	13,00±0,00 ^a	13,00±0,00 ^a
	Atividade PO (unit.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	41,53±5,94	37,20±4,17	45,38±3,87
Após	Total de hemócitos (10^6 cels/mL ⁻¹)	20,48±5,08 ^b	34,20±3,85 ^a	29,67±5,65 ^a
	Granular (10^6 cels/mL ⁻¹)	11,21±2,59 ^b	21,51±3,16 ^a	17,87±3,99 ^a
	Hialino (10^6 cels/mL ⁻¹)	9,27±2,56	12,69±1,91	11,86±1,64
	Aglutinação (\log_2 x+1)	10,50±0,66	10,75±0,50	9,75±0,50
	Atividade PO (unit.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	37,64±2,55	45,27±4,52	38,63±5,18

* Diferentes letras indicam diferenças estatísticas no teste de SNK com nível de significância de 5%.

O efeito do butirato como moderador da resposta imunológica de outros animais e humanos já é conhecido, principalmente por atuar como inibidor do estresse oxidativo de tecidos, em especial no epitélio intestinal (Hamer et al., 2008; Zhang et al., 2011). Além disso, um

estudo com dourada (*S. Aurata*) mostrou que a suplementação dietética de butirato de sódio aumentou a concentração de diversos metabólitos no intestino dos peixes, entre eles alguns intermediários redox, como NAD, NADH, homoserina e ácido diidrofólico (Robles et al., 2013). Isto pode explicar o aumento da resposta imunológica de diversos animais com a suplementação de derivados de ácido butírico. Contudo, este assunto deve ser melhor estudado para sua total compreensão.

25.6 Mortalidade acumulada

Após 96 h do desafio experimental com *Vibrio* sp. os camarões alimentados com butirato de sódio apresentaram mortalidade acumulada de 5,8%, enquanto os camarões do controle apresentaram mortalidade de 13,2% (Figura 9). No entanto, foi observada uma grande variação na mortalidade entre os diferentes tanques dos mesmos tratamentos, e mesmo alterando a microbiota intestinal e melhorando alguns parâmetros hemato-imunológicos, não foi possível detectar diferenças estatísticas significativas na mortalidade acumulada dos camarões infectados. *L. vannamei* cultivados em água clara e suplementados com diferentes doses (0,5-2%) de propionato e butirato também não apresentaram diferenças na mortalidade acumulada após infecção com *Vibrio* sp., utilizando uma concentração maior no desafio (DL₅₀) (Bolívar et al., 2013). Todavia, o uso de ácido butírico e PHB na água aumentou a sobrevivência de artêmia infectadas com *V. campbellii* (Defoirdt et al., 2006, 2007).

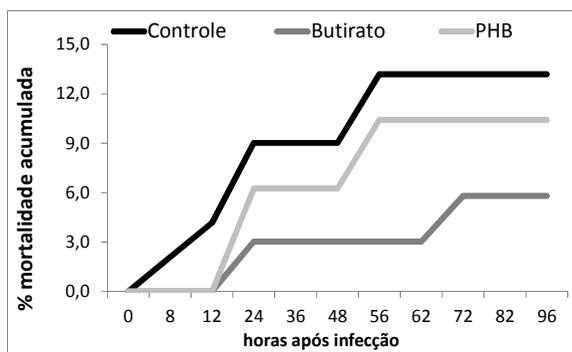


Figura 9 – Mortalidade acumulada (%) de *Litopenaeus vannamei* cultivado em sistema superintensivo de bioflocos, suplementados com butirato de sódio e polihidroxibutirato (PHB) e desafiado com 1×10^5 unidades formadoras de colônia por camarão de *Vibrio* sp. (DL₁₀).

24 CONCLUSÕES

A suplementação dietética dos aditivos avaliados, com destaque ao butirato de sódio, para *L. vannamei* cultivados em sistema superintensivo de bioflocos alterou a microbiota intestinal dos camarões marinhos, reduzindo a concentração de vibrios; atuou como modulador do sistema imunológico, aumentando a quantidade total e diferencial de hemócitos além do título de aglutinação; aumentando assim a sobrevivência e conseqüentemente a produtividade do cultivo. Contudo, o uso destes aditivos alimentares não influenciou no ganho de peso nem no aproveitamento de nutrientes durante o cultivo de camarões marinhos neste sistema de cultivo e nem na sobrevivência após do desafio com *Vibrio* sp. patogênico para camarão marinho.

25 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo suporte no projeto “Bases Nutricionais para o Desenvolvimento de Dietas voltadas para o Cultivo do Camarão *Litopenaeus vannamei* em Regime Intensivo com Flocos Microbianos e Troca Mínima de Água – FINEP/RECARCINA - 2010-2012”. Agradecemos também as empresas IMCOPA e Guabi por disponibilizar os ingredientes necessários para preparação das dietas experimentais, além da empresa PHB Industrial S/A e ao Eduardo Brondi, pelo fornecimento do PHB (Biocycle® 1000). Além de agradecer o suporte do Dr. Mauricio Laterça Martins do Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS-UFSC), Dr. Alberto Nunes e Msc. Hassan Sabry Neto do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC), e pelo suporte técnico de Marcello Mendes, Scheila Anelise Pereira, Gabriel Fernandes Alves de Jesus e Lucas Mendes.

26 REFERÊNCIAS

Adil, S., Banday, T., Bhat, G. A., Mir, M. S., Rehman, M., 2010. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Vet. Med. Internat.* Article ID 47948.

Adil, S., Bandy, T., Bhat, G., Salahuddin, M., Raquib, M., Shanaz, S., 2011. Response of broiler chicken to dietary supplementation of organic acids. *J. Cent. Eur. Agricult.* 12(3), 498-508.

Anuta, D.J., Buentello, A., Patnaik, S., Lawrence, A.L., Mustafa, A., Hume, M., Gatlin III, D.M., Kemp, M.C., 2011. Effect of dietary supplementation of acidic calcium sulfate (vitoxal) on growth, survival, immune response and gut microbiota of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 42, 834-844.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists, 1999. *Official Methods of Analyses*. 16th ed., Arlington, VA.

APHA, AWWA. "WEF, 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association." Inc., Baltimore, MD USA.

Baruah, K., Paul, A.K., Sahu, N.P., Jain K.K., Mukherjee, S.C., Debnath, D, 2005. Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. *Aquac. Res.* 36, 803 – 812.

Baruah, K., Sahu, Pal, A.K., Debnath, D., Yengkokpam, S., 2007. Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), juveniles. *J. World Aquacult. Soc.* 38 (2), 238 – 249.

Bjerkeng, B., Storebakken, T., Wathne, E., 1999. Cholesterol and short-chain fatty acids in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effects on growth, organ indices, macronutrient digestibility, and fatty acid composition. *Aquac. Nutr.* 5(3), 181–191.

Bolívar, N., Silva, B. C., Pereira, S., Jesus, G. F. A., Soares, M., Mouriño, J. L. P., Vieira, F. N., Seiffert, W. Q., 2013. Parâmetros hemato-imunológicos de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas contendo propionato e butirato. In: X FENACAM, 2013, Natal-RN. Manual Fenacam 2013, 2013. 101p.

Boyd, C.E., Gautier, D., 2000. Effluent composition and water quality standards. *Glob. Aquac. Advocate*, 3, 61–66.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248 – 254.

- Bratvold, D., Browdy, C. L., 2001. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats™) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture*, 195, 81-94.
- Cabello, F. C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8(7), 1137-1144.
- Cheng, W., Liu, C.H., Kuo, C.M., Chen, J.C., 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shell. Immunol.* 18(1), 1 – 12.
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., Guillaume, J., 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*. 235, 513-531.
- Defoirdt, T., Halet, D., Sorgeloos, P., Bossier, P., Verstraete, W., 2006. Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Aquaculture*. 261, 804–808.
- Defoirdt, T., Halet, D., Vervaeren, H., Boon, N., Wiele, T.V., Sorgeloos, P., Bossier, P., Verstraete, W., 2007. The bacterial storage compound poly-b-hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environ. Microbiol.* 9(2), 445 – 452.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.* 14(3), 251 – 258.
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., Bisogni, J. J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*. 257(1), 346-358.
- Galfi, P., Bokori, J., 1990. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. *Acta Vet. Hung.* 38(1–2), 3–17.
- Gao, Y., Storebakken, T., Shearer, K. D., Penn, M., Øverland, M., 2011. Supplementation of fishmeal and plant protein-based diets for rainbow trout with a mixture of sodium formate and butyrate. *Aquaculture*. 311(1), 233-240.

- Hamer, H. M., Jonkers, D. M. A. E., Venema, K., Vanhoutvin, S. A. L. W., Troost, F. J., Brummer, R. J., 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment. Pharm. Ther.* 27(2), 104-119.
- Hamlin, H. J., Michaels, J. T., Beaulaton, C. M., Graham, W. F., Dutt, W., Steinbach, P, Main, K. L., 2008. Comparing denitrification rates and carbon sources in commercial scale upflow denitrification biological filters in aquaculture. *Aquacult. Eng.* 38(2), 79-92.
- Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B. E., Kautsky, N., 2003. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *Int. J. Food. Sci. Tech.* 38(3), 255-266.
- Hossain, M.A., Pandey, A., Satoh, S., 2007. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sci.* 73, 1309 – 1317.
- Khajepour, F., Hosseini, S.A, 2012. Calcium and phosphorus status in juvenile beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. *Aquac.Res.* 43(3), 407–411.
- Lightner, D. V., 2005. Biosecurity in shrimp farming: Pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquacult. Soc.*, 36(3), 229-248.
- Liu, C.H., Yeh, S.P., Kuo, C. ., Cheng, W., Chou, C.H., 2006. The effect of sodium alginate on the immune response of tiger shrimp via dietary administration: activity and gene transcription. *Fish Shell. Immunol.* 21(4), 442 – 452.
- Lückstädt, C., 2008. The use of acidifiers in fish nutrition. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. Nutr. and Nat. Resour.* 3 (044), 1–8.
- Maggioni, D.G., Andreatta, E.R., Hermes, E.M., Barracco, M.A., 2004. 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 ostimulation. *Aquaculture.* 241 501 – 515.
- Mcintosh, P.R., 2001. Changing paradigms in shrimp farming: V. Establishment of heterotrophic bacterial communities. *Global Aquac. Adv.*, 4, 44–50.

- Moss, S.M., Forster, I.P., Tacon, A.G.J., 2006. Sparing effect of pond water on vitamins in shrimp diets. *Aquaculture*, 258, 388–395.
- Nhan, T.D., Wille, M., Schryver, P., Defoirdt, T., Bossier, P., Sorgeloos, P., 2010. The effect of poly β -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. 302, 76–81.
- Nuez-Ortin, W. G., 2011a. Gustor-Aqua: An effective solution to optimize health status and nutrient utilization. International Aquafeed May-June, 18-20.
- Nuez-Ortin, W. G., 2011b. Antimicrobial properties of Gustor B92 against pathogenic bacteria of freshwater fish and marine shrimp. In: Conference proceedings world aquaculture society 2011, Natal, Brazil.
- Owen, M. A. G., Wainnes, P., Bradley, G., Davies, S., 2006. The effect of dietary supplementation of sodium butyrate on the growth and microflora of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). XII international symposium fish nutrition and feeding, May 28–June 1, Book of abstracts: 149.
- Ray, A. J., Lewis, B. L., Browdy, C. L., Leffler, J. W., 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture*. 299, 89–98.
- Robles, R., Lozano, A. B., Sevilla, A., Márquez, L., Nuez-Ortín, W., Moyano, F. J., 2013. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 39, 1567–1580.
- Sarker, S.A., Satoh, S., Kiron, V., 2005. Supplementation of citric acid and amino acid-chelated trace element to develop environment-friendly feed for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*. 248, 3–11.
- Sarker, M.S.A., Satoh, S., Kamata, K., Haga, Y., Yamamoto, Y., 2012a. Partial replacement of fish meal with plant protein sources using organic acids to practical diets for juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquacult. Nutr.* 18(1), 81-89.
- Sarker, M.S.A., Satoh, S., Kamata, K., Haga, Y., Yamamoto, Y., 2012b. Supplementation effect(s) of organic acids and/or lipid to plant protein-based diets on juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck et

- Schlegel 1845, growth and, nitrogen and phosphorus excretion. *Aquac. Res.* 43, 538–545.
- Schryver, P., Sinha, A.K., Kunwar, P.S., Baruah, K., Verstraete, W., Boon, N., Boeck, G., Bossier, P., 2010. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1535 – 1541.
- Schveitzer, R., Arantes, R., Baloi, M. F., Costódio, P. F., Arana, L. V., Seiffert, W. Q., Andreatta, E. R., 2013a. Use of artificial substrates in the culture of *Litopenaeus vannamei* (Biofloc System) at different stocking densities: Effects on microbial activity, water quality and production rates. *Aquacult. Eng.* 54, 93-103.
- Schveitzer, R., Arantes, R., Costódio, P. F. S., Santo, C. M., Arana, L. V., Seiffert, W. Q., Andreatta, E. R., 2013b. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange. *Aquacult. Eng.* 56, 59-70.
- Silva, B.C., Vieira, F.D.N., Mouriño, J.L.P., Ferreira, G.S., Seiffert, W.Q., 2013. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture.* 384-387, 104 – 110.
- Silva, B. C., Bolívar, N., Pereira, S., Santos Junior, M. M., Mouriño, J. L. P., Redig, J., Vieira, F. N., Seiffert, W. Q., 2013b. Uso de sais orgânicos na dieta melhora o desempenho zootécnico de camarões marinhos. In: X FENACAM, 2013, Natal-RN. Manual Fenacam 2013, p. 31.
- Silva, K. R., Wasielesky, W., Abreu, P. C., 2013c. Nitrogen and phosphorus dynamics in the biofloc production of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacul. Soc.* 44(1), 30-41.
- Skjermo, J., Vadstein, O., 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture.* 177 (1-4), 333-343.
- Söderhäll, K., Häll, L., 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochim. Biophys. Acta.* 797, 99 – 104.

Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., A., 1972. Practical Handbook of Seawater Analysis, vol. 167. Bulletin of Fisheries Research Board, Canada, pp. 310.

Tran, L., Nunan, L., Redman, R.M., Mohney, L.L., Pantoja, C.R., Fitzsimmons, K., Lightner, D. V., 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Dis. Aquat. Org. 105, 45 – 55.

Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy C., 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.

Yeh, M.S., Lai, C.Y., Liu, C.H., Kuo, C.M., Cheng, W., 2009. A second proPO present in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and expression of the proPOs during a *Vibrio alginolyticus* injection, molt stage, and oral sodium alginate ingestion. Fish Shell. Immunol. 26(1), 49 – 55.

Zhang, W. H., Jiang, Y., Zhu, Q. F., Gao, F., Dai, S. F., Chen, J., Zhou, G. H., 2011. Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. Brit. Poultry Sci. 52(3), 292-301.

Zheng, R. G., 2009) The effect of sodium butyrate on the growth performance and intestinal mucous structure of fresh water fish. PhD thesis <http://www.globethesis.com/?t=2143360272979206>.

CONCLUSÕES GERAIS

- a) Dentre os sais orgânicos avaliados o formiato, acetato, propionato e butirato apresentaram potencial de inibição *in vitro* contra cepas de vibrios patogênicos para camarões marinhos;
- b) O butirato e propionato de sódio apresentaram aumento da atratividade e consumo de dietas para camarões marinhos;
- c) A suplementação dietética de propionato apresentou melhorias na digestibilidade de energia e fósforo das dietas para *Litopenaeus vannamei*;
- d) De forma geral os sais orgânicos apresentaram rápida lixiviação nas dietas em água marinha;
- e) A suplementação dietética de propionato e butirato apresentaram melhorias no ganho de peso de *L. vannamei* em engorda em água clara, além da mudança na microbiota intestinal e aumento do título de aglutinação;
- f) A suplementação dietética para *L. vannamei* de butirato de sódio em diferentes concentrações melhorou a sobrevivência, eficiência alimentar, produtividade, retenção de nitrogênio e taxa de eficiência proteica, em engorda em água clara.
- g) No cultivo em bioflocos a suplementação de 2% de butirato de sódio aumentou a sobrevivência e produtividade do cultivo, além de diminuir a concentração de bactérias heterotróficas totais e vibrios no intestino,
- h) A suplementação dietética de butirato e polihidroxibutirato (PHB) para *L. vannamei* cultivado em sistema superintensivo de bioflocos, aumentaram o número de hemócitos totais e granulares.
- i) Contudo, tanto em água clara como em bioflocos a suplementação de sais orgânicos não foi capaz de aumentar a sobrevivência após desafios experimentais com *Vibrio* sp. realizados por injeção dorsal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou o potencial de sais orgânicos, principalmente o butirato de sódio, como aditivo alimentar para camarões marinhos, melhorando parâmetros nutricionais e imunológicos de *Litopenaeus vannamei* em diferentes sistemas de cultivo. Todavia, alguns pontos importantes devem ser destacados para trabalhos futuros.

A suplementação de butirato de sódio apresentou na engorda em água clara melhoria no crescimento e eficiência alimentar dos camarões marinhos, porém alguns benefícios já conhecidos em animais terrestres (suínos e aves), como aumento do número e altura das vilosidades intestinais, além de outros parâmetros fisiológicos, não foram avaliados e podem ser temas de estudos futuros.

Os sais orgânicos são altamente hidrossolúveis e apresentaram alta lixiviação em água salgada neste estudo. Com isso, formas protegidas de sais orgânicos, como é o caso de alguns produtos comerciais de butirato de sódio protegido em óleos vegetais, pode ser avaliada para melhor eficácia e com isso, a utilização de concentrações mais baixas nas dietas, aumentando assim a viabilidade comercial destes.

O uso do polihidroxibutirato (PHB) é uma alternativa ao uso do butirato de sódio, por ser uma molécula hidrofóbica. Porém, este composto necessita ser quebrado pela microbiota intestinal para que seja liberado o ácido butírico, perdendo assim eficiência. Sendo assim, trabalhos com uso de bactérias degradadoras de PHB, ou até mesmo o uso de moléculas de PHB de baixo peso molecular, podem ser utilizadas para o melhor aproveitamento e eficiência deste aditivo alimentar.

O uso de outros sais orgânicos também se torna necessário para avaliarmos o potencial dos sais não avaliados neste estudo. Um exemplo é o fumarato de sódio que obteve ótimos resultados em pré-ensaios realizados por nosso grupo em conjunto com pesquisadores do *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste* (CIBNOR, México).

Além de outros sais orgânicos, o uso de misturas entre sais orgânicos, para avaliar um possível efeito sinérgico entre os sais, e o uso de sais ou ácidos orgânicos com intuito de potencializar o efeito de cepas ácido lácticas probióticas para camarões marinhos também se torna interessante.

Finalmente, ensaios em escala comercial avaliando, além do desempenho do cultivo, a avaliação econômica do uso deste aditivo em diferentes sistemas, são necessários para que este conhecimento atinja a cadeia produtiva como um todo.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- ADAMS, D.; BOOPATHY, R. Use of formic acid to control vibriosis in shrimp aquaculture. **Biologia**, v 68 (6), p.1017-1021, 2013.
- ADIL, S. et al. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. **Veterinary Medicine International**, Article ID 47948, 2010.
- ADIL, S. et al. Response of broiler chicken to dietary supplementation of organic acids. **Journal of Central European Agriculture**, v.12(3), p.498-508 , 2011.
- ANUTA, D.J.; BUENTELLO, A.; PATNAIK, S.; LAWRENCE, A.L.; MUSTAFA, A.; HUME, M.; GATLIN III, D.M.; KEMP, M.C. Effect of dietary supplementation of acidic calcium sulfate (Vitoxal) on growth, survival, immune response and gut microbiota of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal World Aquaculture Society**, v. 42, p. 834-844, 2011.
- AVNIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, p. 176, v. 227–235, 1999.
- AVNIMELECH, Y. Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. **Aquacultural Engineering** v. 34, p. 172–178, 2006.
- BALCÁZAR, J. L. et al. The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.173-186, 2006.
- BARRACCO, M. A., PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Inmunología en camaróns Capítulo 6. In: MORALES, V e CUELLAR-ANGEL J. (eds). **Guía Práctica de Inmunología y Patología del Camarón**. Ed. CYTED, pp. 169 – 224. 2008.
- BARUAH, K. et al. Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 803-812, 2005.
- BARUAH, K. et al. S. Interactions of Dietary Microbial Phytase, Citric Acid and Crude Protein Level on Mineral Utilization by Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), Juveniles. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 38 (2), p. 238-249, 2007.
- BATICADOS, M. C. L. et al. Studies on the Chemical Control of Luminous Bacteria *Vibrio harveyi* and *Vibrio splendidus* Isolated from Diseased *Penaeus monodon* Larva and Rearing Water. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 9 (2), p. 133-139, 1990.
- BLANK, R., et al. Effects of formic acid and phytase supplementation on digestibility and use of phosphorus and zinc in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 90 (4), p. 212-214, 2012.

BRATVOLD, D., BROWDY, C. L. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats™) on production, water quality, and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. **Aquaculture**, v.195, p.81-94, 2001.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8(7), p. 1137-1144, 2006.

CARDOSO, E. J. B. N.; NOGUEIRA, M. A. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: **Silveira, A. P. D.; Freitas, S. S. (org.). Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico, 2007, p.78-96.

CASTEX, M. et al. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28(4), p. 622-631, 2008.

CHANG, J. et al. Effects of dietary β -glucan and glycyrrhizin on non-specific immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) challenged with *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture Research**, v. 42(8), p. 1101 – 1109, 2011.

CHENG, W. et al. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 18(1), p 1 – 12, 2005.

CUZON, G. et al. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, v. 235, p. 513-531, 2004.

DEFOIRD, T. et al. Short-chain fatty acids protect gnotobiotic *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. **Aquaculture**, v. 261, p. 804–808, 2006.

DEFOIRD, T. et al. The bacterial storage compound poly-b-hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. **Environmental Microbiology**, v. 9(2), p. 445 – 452, 2007.

DEFOIRD, T. et al. Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 680 – 685, 2009.

DEFOIRD, T.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14(3), p.251 – 258, 2011.

ENCARNAÇÃO, P. Varied Feed Additives Improve Gut, Animal Health. **Global Aquaculture Advocate**, v. 3 (5/6), p. 41-41, 2010.

FAO-FISHSTAT. 2013. **FAO Fisheries Data Statistical Reporting Software**. Disponível em <www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en>. Acesso em 09 de janeiro de 2014.

FU, Y. et al. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & shellfish immunology**, v.22 (6), p. 673-685, 2007.

GALFI, P.; BOKORI, J. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 38(1-2), p.3-17, 1990.

GAO, Y. et al. Supplementation of fishmeal and plant protein-based diets for rainbow trout with a mixture of sodium formate and butyrate. **Aquaculture**, v.311, p.233-240, 2011.

GIBSON, G.R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v.17, p.259-75, 2004.

GOOSEN, N. J. et al. Organic acids as potential growth promoters in the South African abalone *Haliotis midae*. **Aquaculture**, v. 321 (3), p. 245-251, 2011.

GULLIAN, M.; THOMPSON, F.; RODRIGUEZ, J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.233, p.1-14, 2004.

HALAS, D., et al. Dietary supplementation with benzoic acid improves apparent ileal digestibility of total nitrogen and increases villous height and caecal microbial diversity in weaner pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v.160 (3), p. 137-147, 2010.

HAMER, H. et al. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 27 (2), p. 104-119, 2008.

HOLMSTROM, K. et al. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38 (3), p. 255-266, 2003.

HOSSAIN, M.A.; PANDEY, A.; SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science**, v. 73, p. 1309-1317, 2007.

HUANG, X.; ZHOU, H.; ZHANG, H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20 (5), p. 750-757, 2006.

JAAFAR, R. M. et al. Gut microbiota changes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during organic acid feed supplementation and *Yersinia ruckeri* infection. **Journal of Fish Diseases**, v. 36, p.599-606, 2013.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere—a critical review. **Plant and Soil**, v. 205 (1), p. 25-44, 1998.

KHAJEPOUR, F.; HOSSEINI, S. A. Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. **Aquaculture Research**, v. 43 (3), p. 407-411, 2012a.

KHAJEPOUR, F.; HOSSEINI, S. A. Citric acid improves growth performance and phosphorus digestibility in Beluga (*Huso huso*) fed diets where soybean meal partly replaced fish meal. **Animal Feed Science and Technology**, v. 171 (1), p. 68-73, 2012b.

KONGNUM, K., HONGPATTARAKERE, T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32(1), p. 170-177, 2012.

KÜHLMANN, K. J.; JINTASATAPORN, O.; LÜCKSTÄDT, C. Dietary potassium-diformate (KDF) improves growth performance of white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* under controlled conditions. **International Aquafeed**, March-April, 19-22, 2011.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.A.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. New York: Worth Publishers, 1232p, 2007.

LEINER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 31–67, 1994.

LI, P. et al. Dietary supplementation of short-chain fructooligosaccharides influences gastrointestinal microbiota composition and immunity characteristics of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in a recirculating system. **The Journal of Nutrition**, v. 137 (12), p. 2763-2768, 2007.

LIGHTNER, D. V. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHNV, WSSV, TSV and YHV: history in the Americas and current status. **In:Proceedings of the 32nd Joint UJNR Aquaculture Panel Symposium**, Davis and Santa Barbara, California, USA. 2003. p. 17-20.

LIGHTNER, D. V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v., 110 (2), p. 174-183, 2012a.

LIGHTNER, D. V. et al. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. **Global Aquaculture Advocate Magazine**, Jan-Feb, p. 40, 2012b.

- LIM, C.; LÜCKSTÄDTS, C.; KLESIUS, P.H. Review: Use Of Organic Acids, Salts In Fish Diets. **Global Aquaculture Advocate**, v.5 (9/10), p. 45 - 46, 2010.
- LIU, C. et al. The effect of sodium alginate on the immune response of tiger shrimp via dietary administration: activity and gene transcription. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 21 (4), p. 442-452, 2006.
- LIU, Y. et al. PHB-degrading bacteria isolated from the gastrointestinal tract of aquatic animals as protective actors against luminescent vibriosis. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.74, p.196-204, 2010.
- LIU, H. et al. The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) as determined by PCR-DGGE and clone library analyses. **Aquaculture**, v. 317 (1), p. 32-36, 2011a.
- LIU, X. et al. The effect of dietary *Panax ginseng* polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30 (2), p. 495-500, 2011b.
- LU, H.; SU, S.; AJUWON, K. M. Butyrate supplementation to gestating sows and piglets induces muscle and adipose tissue oxidative genes and improves growth performance. **Journal of Animal Science**, v. 90, (4), p. 430-432, 2012.
- LÜCKSTÄDTS, C. Acidifiers in aquaculture prove beneficial. **Feed Mix**, v.14 (3), p. 11-12, 2006.
- LÜCKSTÄDTS, C. The use of acidifiers in fisheries and aquaculture. In: **Acidifiers in Animal Nutrition: A Guide to Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance** (LÜCKSTÄDTS, C. ed.), pp. 71 – 79. Nottingham University Press, United Kingdom, 2007.
- LÜCKSTÄDTS, C. The use of acidifiers in fish nutrition. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 44 (3), p. 1 – 8, 2008.
- MAGALLÓN-BARAJAS, F. Comunicação pessoal. 2013.
- MCINTOSH, P.R. Changing paradigms in shrimp farming: V. Establishment of heterotrophic bacterial communities. **Global Aquaculture Advocate**, v. 4, p. 44-50, 2001.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA) Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-proibidos>. Acesso em: 25 de dezembro de 2013.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. 2011.

MERRIFIELD, D. L. et al. Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestinal microbial balance, intestinal histology and growth performance. **Cell and tissue research**, v. 344 (1), p. 135-146, 2011.

MINE, S.; BOOPATHY, R. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. **Current microbiology**, v. 63(1), p.1-7, 2011.

MORALES, V.; CUELLAR-ANJEL, J. **Guía técnica-Patología e inmunología de camarones peneidos**. Programa CYTEC Red II-D Vannamei. Panamá, 2008

MORKEN, T. et al. Sodium diformate and extrusion temperature affects nutrient digestibility and physical quality of diets with fish meal and barley protein concentrate for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.317 (1-4), p.138-145, 2011.

MORKEN, T. ET AL. Effects of feed processing conditions and acid salts on nutrient digestibility and physical quality of soy-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, p. 21-34, 2012.

MOURIÑO, J.L.P. et al. Avaliação bacteriológica aplicada à produção de pós-larvas de *Penaeus vannamei*. **Atlântica**, v.30, p.9-16, 2008.

MOURINO, J. L. P. et al. Probióticos na Aquicultura. In: **Ângela Teresa Silva-Souza, Maria de los Angeles P. Lizama e Ricardo Massato Takemoto. (Org.). Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. 1ed.Maringá-PR: ABRAPOA, 2012, p. 381-404.

MOSS, S.M.; FORSTER, I.P.; TACON, A.G.J. Sparing effect of pond water on vitamins in shrimp diets. **Aquaculture**, v. 258, p. 388–395, 2006.

NG, W. et al.. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 1490-1500, 2009.

NG, W. et al. Organic Acids Potential Replacement For Antibiotic Treatments Of Tilapia. **Global Aquaculture Advocate**, v.5 (9/10), p. 93-94, 2010.

NHAN, T.D. et al. The effect of poly β -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, v. 302, p. 76-81, 2010.

NOLASCO, H. Comunicação pessoal. 2013.

Nuez-Ortin, W.G. Gustor-Aqua: An effective solution to optimize health status and nutrient utilization. **International Aquafeed**, May-June, 18-20, 2011.

PANDEY, A.; SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Science**, v. 74, p.867-874, 2008.

- PARTANEN, K.H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, v.12, p. 117-145, 1999.
- PHUOC, L. H. et al. Effect of dose and challenge routes of *Vibrio* spp. on co-infection with white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 290(1), p. 61-68, 2009.
- PRUDER, G. D. Biosecurity: application in aquaculture **Aquacultural Engineering** v. 32, p.3 – 10, 2004.
- 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, p.89–98, 2010.
- RINGO, E. Effects of dietary lactate and propionate on growth and digesta in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). **Aquaculture**, v.96, p.321 – 333, 1991.
- RINGO, E.; OLSEN, R.E.; CASTELL, J.D. Effect of dietary lactate on growth and chemical composition of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 25 (3), p. 483 – 486, 1994.
- RINGØ, E. et al. Prebiotics in aquaculture: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 16.2, p. 117-136, 2010.
- ROBLES, R. et al. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 1537-1580, 2013.
- RODRIGUEZ, J. et al. Exposure to probiotics and beta-1,3/1,6-glucans in larviculture modifies the immune response of *Penaeus vannamei* juveniles and both the survival to White Spot Syndrome Virus challenge and pond culture. **Aquaculture**, v. 273 (4), p. 405-415, 2007.
- SARKER, M.S.A.; SATOH, S.; KIRON, V. Supplementation of citric acid and amino acid-chelated trace element to develop environment-friendly feed for red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture**, v.248, p. 3– 11, 2005.
- SARKER, M.S.A. et al. Supplementation effect(s) of organic acids and/or lipid to plant protein-based diets on juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck et Schlegel 1845, growth and, nitrogen and phosphorus excretion. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 538–545, 2012a.
- SARKER, M.S.A. et al. Partial replacement of fish meal with plant protein sources using organic acids to practical diets for juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. **Aquaculture Nutrition**, v. 18(1), p.81-89, 2012b.
- SCHRYVER, P. et al. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 86, p.1535-1541, 2010.

SCHUUR, A. M. Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming **Aquacultural Engineering** v.28, p. 3 – 10. 2003.

SCHVEITZER, R. et al. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water Exchange. **Aquacultural Engineering**, v.56, p.59-70, 2013.

SERRANO, P. H. **Responsible use of antibiotics in aquaculture**. FAO, 2005.

SILVA, B. C. et al. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. **Aquaculture**, v. 384-387, p. 104-110, 2013.

SIRIPAISAN, C. et al. Application of beta-glucan as immunostimulant in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). In: **Proceedings of the 44th Kasetsart University Annual Conference, Kasetsart, 30-January-2 February, 2006**. Subject: Fisheries. Kasetsart University, p. 279-290, 2006.

SKJERMO, J.; VADSTEIN, O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. **Aquaculture**, v. 177 (1-4), p. 333-343, 1999.

SMITH, P. Antimicrobial use in shrimp farming in Ecuador and emerging multi-resistance during the cholera epidemic of 1991: a re-examination of the data. **Aquaculture**, v. 271 (1), p. 1-7, 2007.

SOTO-RODRIGUEZ, S.; ARMENTA, M.; GOMEZ-GIL, B. Effects of enrofloxacin and florfenicol on survival and bacterial population in an experimental infection with luminescent *Vibrio campbellii* in shrimp larvae of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 255, (1-4), p. 48-54, 2006.

TAW, N. Biofloc technology expanding at white shrimp farms biofloc systems deliver high productivity with sustainability. **Global Aquaculture Advocate**, v. 2 (5/6), p. 20 – 22, 2010.

TAYAG, C. M. et al. 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**, v.28.5, p.764-773, 2010.

TRAN, L. et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases Aquatic Organisms**, v. 105, p 45-55, 2013.

VANDENBERGHE, J. et al. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. **Aquaculture**, v. 169.1, p. 121-132, 1998.

VAZQUEZ, J.A.; GONZALEZ, M.P.; MURADO, M.A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**, v. 245, p.149 – 161, 2005.

- VERSCHUERE, L. et al. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64 (4), p. 655-671, 2000.
- VIEIRA, F.N. et al. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43(6), p. 763 – 769, 2008.
- VIEIRA, F.N. et al. Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. **Arquivos Brasileiros de Veterinária e Zootecnia**, v. 62(3), p. 631-638, 2010.
- VIELMA, J.; LALL, S.P. Dietary formic acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Nutrition**, v. 3, p. 265-268, 1997.
- VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **Fems Microbiology Reviews**, v. 30 (3), p. 404-427, 2006.
- VIOLA, E.S.; VIEIRA, S.L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36 (4), p. 1097 – 1104, 2007.
- XIE, B.S.; ZHANG, L.; WANG, D. Effects of several organic acids on the feeding behavior of *Tilapia nilotica*. **Journal Applied Ichthyology**, v.19, p. 255 – 257, 2003.
- YEH, M.S. et al. A second proPO present in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and expression of the proPOs during a *Vibrio alginolyticus* injection, molt stage, and oral sodium alginate ingestion. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26(1), p. 49 – 55, 2009.
- YOUSEFIAN, M.; AMIRI, M. S. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. **African Journal of Biotechnology**, v. 8(25), p. 7313-7320, 2009.
- ZHANG, W. H. et al. Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 52.3, p. 292-301, 2011.
- WASIELESKY, W. et al. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.258, p.396–403, 2006.
- ZHOU, X. X.; WANG, Y. B.; LI, W. F. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 287, (3-4), p. 349-353, 2009.

ZHOU, Z. et al. Effects of dietary potassium diformate (KDF) on growth performance, feed conversion and intestinal bacterial community of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂). **Aquaculture**, v. 291(1), p. 89-94, 2009.

ZHOU, Z.; DING, Z.; HUIYUAN, L. V. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38 (2), p. 296-301, 2007.

ANEXO I

Sala de observação comportamental animal com labirinto em Y, para ensaios de atratividade de dietas para camarões marinhos.



ANEXO II

Sala experimental com aquários de 60 L.



ANEXO III

Sala de Maturação do LCM utilizada no ensaio de engorda em água clara (tanques de 6.000 L).



ANEXO IV

Tanques de 40 L utilizados nos desafios experimentais com *Vibrio*.



ANEXO V

Equipamentos (moedor, misturador, estrusora, secador) do LABOMAR-UFC utilizados para preparação das dietas experimentais.



ANEXO VI

Unidades experimentais (1.000 L) utilizadas nos ensaios e engorda em bioflocos.

