

Mirelli Karlla da Silva Sousa Bruno

Desempenho zootécnico e imunocompetência de juvenis de
Litopenaeus vannamei submetidos à hipóxia

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Luis Alejandro Vinatea Arana

Florianópolis
2017

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

Bruno, Mirelli Karlla da Silva Sousa
Desempenho zootécnico e imunocompetência de
juvenis de *Litopenaus vannamei* submetidos à hipóxia /
Mirelli Karlla da Silva Sousa Bruno ; orientador,
Luis Alejandro Vinatea Arana, 2017.
51 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Saturação de oxigênio. 3.
Carcinicultura. 4. Parâmetros imunológicos . 5.
Qualidade da água. I. Vinatea Arana, Luis Alejandro
. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Desempenho zootécnico e imunocompetência de juvenis de
Litopenaeus vannamei submetidos à hipóxia**

Por

MIRELLI KARLLA DA SILVA SOUSA BRUNO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

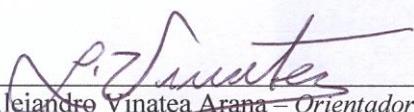
MESTRE EM AQUICULTURA

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

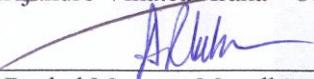


Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



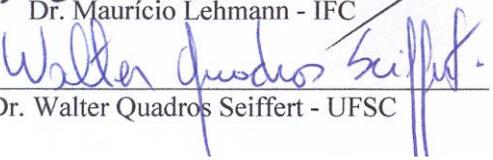
Dr. Luiz Alejandro Vinatea Arana - Orientador



Dra. Aime Rachel Magenta Magalhães - UFSC



Dr. Mauricio Lehmann - IFC



Dr. Walter Quadros Seiffert - UFSC

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar forças para concluir mais esta etapa em minha vida.

Agradeço à minha família, minha mãe Luiza, sempre calma e paciente em todos os momentos, aos meus irmãos Arthur Bruno e Brunna Bruno pelo companheirismo e cumplicidade.

Ao meu esposo, Fernando Brandão agradeço pela cumplicidade, carinho e atenção, principalmente nos momentos de ausência.

À família do meu esposo, que me acolheu como família também, agradeço pelo apoio, incentivo e confiança.

Minha gratidão aos professores da pós-graduação em Aquicultura da UFSC, principalmente ao professor Dr. Luís Vinatea pela oportunidade e confiança nessa nova missão.

À amiga Carmem Sara pela cumplicidade, incentivo e apoio nesses dois anos de trajetória, sua amizade vou levar comigo.

Gratidão à amiga Patrícia Melo, pelas conversas, preocupação, principalmente nas noites de experimento.

Agradeço ao Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), a todas as pessoas que sempre estiveram disponíveis para me ajudar, nunca medindo esforços para contribuir, muitíssimo obrigada a todos!

Ao pessoal do Departamento de Aquicultura, pela ajuda durante o curso.

A UFSC por oferecer essa excelente estrutura e disponibilizar a nós estudantes.

À Capes pelo apoio financeiro deste estudo.

Agradeço a todos...

“ Mas Deus escolheu as coisas loucas deste mundo para confundir as sábias; e Deus escolheu as coisas fracas deste mundo para confundir as fortes”

1 Coríntios 1:27

RESUMO

A hipóxia é um fator de estresse abiótico comum em ambientes aquáticos que provoca alterações comportamentais nos camarões. Todavia, uma parcela significativa destes organismos desenvolve a capacidade de sobreviver nesta condição, ativando alguns meios fisiológicos de adaptação de curto prazo. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes níveis de saturação de oxigênio (30%, 50% e controle) em sistema de água clara no desempenho zootécnico e parâmetros imunes de juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. O experimento foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos-UFSC entre os meses de março e abril de 2016 durante 32 dias. Os juvenis com peso médio de $7,0 \pm 0,21\text{g}$ foram colocados em aquários contendo 60 L de água, com renovação diária total. A temperatura foi ajustada em $28,0 \pm 0,16^\circ\text{C}$, salinidade 25‰ e pH 8,0. Em todos os tratamentos os parâmetros de qualidade da água, tais como a concentração de oxigênio e a temperatura, foram registrados a cada duas horas; já amônia total e o nitrito (mg.L^{-1}), foram mensurados semanalmente. Ao final do período experimental foi realizada a coleta da hemolinfa para análise dos parâmetros imunes e, por fim, os animais foram contados e pesados. O tratamento com saturação de 50% apresentou os melhores resultados principalmente no peso final, ganho de peso semanal e taxa de crescimento específico. A conversão alimentar aparente não variou estatisticamente e os valores alcançados nos tratamentos estão dentro dos padrões de cultivos atuais. A sobrevivência foi melhor nas saturações de oxigênio acima de 50%. Quanto aos imunoparâmetros que incluem a contagem total de hemócitos (CTH), fenoloxidase (PO), concentração proteica no soro (CP) e atividade aglutinante do soro não diferiram estatisticamente, para as espécies reativas de oxigênio (ERO's) que variou estatisticamente entre o controle e a saturação de 50% para o grupo que não utilizou indutor, houve um aumento gradual, os testes indicaram que estes animais passaram por momentos de estresse, o que poderia indicar que tal situação aumenta a defesa antioxidante dos camarões. Demonstrou-se que os animais se adequaram as condições e que os efeitos da hipóxia parecem diminuir ao longo do tempo, sugerindo que os juvenis de *L. vannamei* conseguem se adaptar a baixas saturações de oxigênio.

Palavra-chave: Aquicultura, saturação de oxigênio, carcinicultura, parâmetros imunológicos e qualidade da água.

ABSTRACT

Hypoxia is a common abiotic stress factor in aquatic environments that causes behavioral changes in shrimp. However, a significant portion of these organisms develops the ability to survive in this condition, activating some physiological means of short-term adaptation. The objective of this work was to evaluate the effect of different levels of oxygen saturation (30%, 50% and control) in a clear water system on the zootechnical performance and immunity parameters of juveniles of *Litopenaeus vannamei* marine shrimp. The experiment was conducted at the Marine Shrimp Laboratory-UFSC between March and April 2016 for 32 days. Juveniles with a mean weight of $7.0 \pm 0.21\text{g}$ were placed in aquaria containing 60 L of water, with total daily renewal. The temperature was adjusted to 28.0 ± 0.16 ° C, salinity 25 ‰ and pH 8.0. In all treatments, water quality parameters, such as oxygen concentration and temperature, were recorded every two hours; Total ammonia and nitrite (mg.L^{-1}) were measured weekly. At the end of the experimental period the hemolymph was collected to analyze the immune parameters and, finally, the animals were counted and weighed. The treatment with saturation of 50% presented the best results mainly in the final weight, weekly weight gain and specific growth rate. The apparent feed conversion did not change statistically and the values reached in the treatments are within the current crop standards. Survival was better at oxygen saturations above 50%. As for the immunoparameters that included total hemocyte count (CTH), phenoloxidase (PO), serum protein concentration (CP) and serum binding activity did not differ statistically, for the reactive oxygen species (ROS), which varied statistically between the control and the 50% saturation for the group that did “not use inductor”, there was a gradual increase, the tests indicated that these animals went through moments of stress, which could indicate that such situation increases the antioxidant defense of the shrimps. The animals were shown to be adequate and the effects of hypoxia appear to decrease over time, suggesting that *L. vannamei* juveniles can adapt to low oxygen saturations.

Key words: Aquaculture, oxygen saturation, shrimp farming, immunological parameters and water quality.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OD – Oxigênio Dissolvido

O_2^- - Ânion superóxido

CTH – Contagem Total de Hemócitos

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

NaCl – Cloreto de sódio

KCl- Cloreto de potássio

KOH – Hidróxido de potássio

PO – Fenoloxidase

proPO – Sistema pro-fenoloxidase

CP – Concentração Proteica

DMSO - Dimetilsulfóxido

$NaHCO_3$ – Bicarbonato de sódio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (a) Contagem total de hemócitos (CTH); (b) Atividade da fenoloxidase (PO); (c) Concentração de proteínas totais no soro (CP) e (d) Determinação do título aglutinante do soro de camarões em diferentes saturações de oxigênio..... 39

Figura 2: Quantificação da produção intracelular de ânions superóxido estimulado pelo indutor laminarina de camarões cultivados em diferentes saturações de oxigênio..... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros zootécnicos dos juvenis de camarões (<i>Litopenaeus vannamei</i>) nas diferentes saturações de oxigênio durante 32 dias em água clara; médias (\pm desvio-padrão) do peso final (PF), ganho de peso semanal (GPS), taxa de crescimento específico (TCE), fator conversão alimentar aparente (FCA), sobrevivência (%) e biomassa (g).....	37
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	21
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	21
1.1.1 Carcinicultura tradicional	21
1.1.2 Importância do oxigênio dissolvido	22
1.1.3 Controle animal à hipóxia	23
1.1.4 Sistema imune de crustáceos	24
1.2 OBJETIVOS	26
1.2.1 Objetivo Geral	26
1.2.2 Objetivo Específico	26
2. DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E IMUNOCOMPETÊNCIA DE JUVENIS DE <i>Litopenaeus vannamei</i> SUBMETIDOS À HIPÓXIA.	27
2.1 INTRODUÇÃO	30
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.2.1 Origem dos animais e condições de aclimação	31
2.2.2 Condições experimentais	32
2.2.3 Procedimento experimental	32
2.2.4 Desempenho zootécnico	33
2.2.5 Parâmetros hemato-imunológicos	33
2.2.5.1 Coleta de hemolinfa para preparação do soro	33
2.2.5.2 Contagem total de hemócitos	33
2.2.5.3 Atividade da enzima fenoloxidase (PO) no soro	33
2.2.5.4 Determinação do título aglutinante do soro	34
2.2.5.5 Concentração de proteínas totais no soro (CP)	34
2.2.5.6 Quantificação da produção intracelular de ânions superóxidos	34
2.2.6 Análise estatística	35

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
2.3.1 Parâmetros de qualidade da água	35
2.3.2 Parâmetros zootécnicos.....	36
2.3.3 Imunoparâmetros.....	38
2.4 CONCLUSÃO	41
2.5 AGRADECIMENTOS	41
2.6 REFERÊNCIAS.....	41
3. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	47
ANEXO	51

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Carcinicultura tradicional

A aquicultura é definida como a produção de organismos aquáticos, tendo predominantemente no seu desenvolver ao menos uma fase ligada à água, em que há o confinamento e o controle. A produção aquícola, aqui listamos a carcinicultura, cultivo de crustáceos, apresentou-se favorável no Brasil devido as condições climáticas e o domínio de novas tecnologias na produção de camarão e tornando este país um dos principais produtores das Américas (Gandini, 2016).

Existem diversos sistemas de cultivo de camarões podendo ser através de tanques escavados em terra, de concreto, fibra de vidro ou através de gaiolas flutuantes (Ribeiro, 2014). Divido em fases: larvicultura, berçário, engorda e despesca de acordo com as singularidades de cada modo de produção. Santos (2014) afirmou que a forma de cultivo predominante adotada no Brasil é o sistema bifásico de cultivo, em que se tem a fase de berçário e engorda, as pós-larvas são adquiridas de empresas especializadas na produção de larvas (larviculturas).

A fase de berçário (primeira fase) tem por finalidade aclimatar as pós-larvas às condições praticadas na fazenda, pois, posteriormente serão transferidas aos viveiros de engorda (Nunes, 2004). A engorda, fase de crescimento, utiliza-se o método de cultivo semi-intensivo. Nesta é ofertado alimento artificial que complementa o natural, as densidades populacionais são moderadas com uma média aproximada de 30 camarões/m² e é visto a utilização de aeradores nos horários em que há a escassez de oxigênio dissolvido (Pontes, 2006).

Nos modos de cultivo, a aeração tem importante função que reflete no bom resultado da produção. Fast & Boyd (1992) afirmaram que existem diferentes formas de introduzir o oxigênio à água, tais como: o fitoplâncton através do processo de fotossíntese, o oxigênio atmosférico obtido por meio da difusão entre a interface ar/água através do vento, na incorporação por meio de renovação de água e também por aeradores mecânicos em que o fornecimento de oxigênio, proporciona a mistura das camadas superiores da água do viveiro, rica em oxigênio dissolvido, com as camadas do fundo que geralmente são mais pobres, promovendo uma distribuição homogênea na coluna d'água (Avnimelech & Ritvo, 2003).

Várias são as técnicas empregadas nas fazendas comerciais, nas fases de berçário e engorda, objetivando sempre alcançar os altos valores de produção (Santos, 2014), entretanto, ainda é observado excessos nos gastos com ração e eletricidade com uso dos aeradores mecânicos.

1.1.2 Importância do oxigênio dissolvido

A qualidade da água é considerada um dos fatores limitantes mais importantes na produção de organismos aquáticos, especialmente para sistemas implantados em viveiros, e o oxigênio dissolvido (OD) é claramente a variável mais crítica em cultivos semi-intensivos e intensivos (Boyd, 1990; Vinatea, 1997). Sabe-se que a dinâmica do oxigênio na água é afetada pela temperatura, pressão atmosférica, salinidade, quantidade de matéria orgânica e também pelos processos fotossintéticos e de respiração, tanto química quanto biológica (Hernandez e Nunes, 2001).

No decorrer do dia, como foi visto por Vinatea (1997) o nível de oxigênio dissolvido tende a elevar-se até chegar ao nível máximo, em sua grande parte, devido aos processos fotossintéticos. Em contrapartida, durante a noite a respiração biológica e a oxidação química do sedimento levam a uma perda significativa do OD presente nos viveiros, podendo chegar a níveis críticos que de certa forma colocariam em risco os organismos cultivados. Estas flutuações do oxigênio dissolvido em tanques variam de acordo com o tipo de cultivo praticado e lembrando que por via de regra, quanto maior a quantidade de organismos por unidade de volume, maior será a variação diurna do oxigênio dissolvido.

Nos sistemas tradicionais de cultivo, segundo Boyd e Clay (1998) periodicamente são removidos os componentes indesejados, tais como: os gases dissolvidos, o fitoplâncton e os agentes patogênicos, realizando-se trocas diárias de 2 a 5% da água do viveiro. Entretanto, é recomendado reduzir a quantidade de alimentos desperdiçados e também manter as doenças sob controle tomando cuidado para não manter viveiros superpovoados ou com larvas infectadas.

Os camarões passam a maior parte do tempo nas camadas mais inferiores dos viveiros e estes locais podem tornar-se zonas de baixa presença de oxigênio dissolvido, sendo mais conhecido como áreas hipóxicas ou até mesmo anóxicas (Zhang et al., 2006). De acordo com Boyd e Clay (1998) cultivos intensos pedem a presença de aeradores mecânicos para que coloquem oxigênio suplementar para evitar que situações de hipóxia aconteçam e prejudiquem o desenvolvimento dos camarões. Diaz e Rosenberg (1995) apresentaram que condições de

hipóxia ou baixa oxigenação é caracterizada pela concentração de OD menor que 2.8 mg.L^{-1} .

Segundo Fast e Boyd (1992) na aquicultura, para se alcançar os níveis desejáveis de sobrevivência e produtividade, faz-se necessário a aplicação de técnicas adequadas de manejo da água e do sedimento. Sendo assim, conforme se intensifica o cultivo, surge a necessidade de atenção para com o manejo.

1.1.3 Controle animal à hipóxia

Cada organismo dispõe de uma quantidade limitada de energia para ser utilizada na realização de atividades tais como escape dos predadores, compensação das flutuações diárias dos parâmetros de qualidade da água, crescimento e reprodução, dentre outras necessidades.

Waterman (1960) afirmou que muitos crustáceos podem ser considerados “conformadores” de oxigênio, isto é, não conseguem modificar o consumo de oxigênio interno face aos níveis de oxigênio ambiental (O_2) em declínio e, assim, reduzir o consumo de O_2 de acordo com a oferta ambiental (Thomas, 1954; Wolverkamp e Waterman, 1960).

Na década de 70 ficou estabelecido que muitos crustáceos possuem uma excelente capacidade reguladora, isto é, conseguem manter constante o consumo de oxigênio, independente da concentração do meio (McMahon, 2001). E ainda, segundo este autor, é possível afirmar que a maioria dos crustáceos são capazes de adaptar-se ao oxigênio do meio para garantir a sobrevivência.

Em situações em que ocorre a transição da normoxia para a hipóxia os crustáceos decápodes apresentam uma “resposta ventilatória”, ou seja, uma ventilação mais intensa nas brânquias realizada pelo escafnatito, um exopodito em forma de “pá” da segunda maxila, que oscila dentro de um canal estreito na cavidade anterior da brânquia, normalmente realizando seu movimento contínuo e assim criando uma pressão nessa câmara para fazer a água circular (McMahon, 2001).

Na maioria dos crustáceos que possuem brânquias lamelares é normal o fluxo ser dirigido para frente, atravessar a brânquia-lamela em um fluxo contracorrente com o da hemolinfa dentro dos filamentos branquiais, proporcionando assim os benefícios da troca de gases (Massabuau, 1983).

Foi visto por Burggren e McMahon (1983) que a exposição inicial à água com baixa concentração de oxigênio aumenta a taxa do bombeamento do escafnatito, resultando num aumento do volume de

ventilação e ainda de acordo com estes autores, através destes mecanismos os decápodes podem aumentar o volume de ventilação em um fator de 5 a 10 vezes, melhorando o fornecimento do O₂ apesar das baixas concentrações de oxigênio do ambiente.

Quanto à resposta circulatória, os decápodes, além das mudanças no fluxo da água pelas brânquias e a afinidade da hemolinfa ao O₂, conseguem ajustar o fluxo da hemolinfa nas brânquias durante a exposição a baixas concentrações de oxigênio. As respostas chegam a ser complexas, no entanto, esta deficiência é amenizada pelo aumento no volume cardíaco que permite a manutenção (McMahon, 1992) ou aumento (Airriess e McMahon, 1994; Massabuau e Burtin, 1984; Reiber e McMahon, 1998) da circulação e, assim, aumenta a perfusão nas brânquias.

Isto aumentaria a superfície de difusão branquial, proporcionando assim maior área para troca dos gases com uma água com baixa concentração de oxigênio. Em consequência, estes mecanismos parecem ser suficientes para proporcionar uma compensação adequada para a exposição à hipóxia (McMahon et al., 1974; Wilkes e McMahon, 1982).

1.1.4 Sistema imune de crustáceos

Os animais invertebrados desenvolveram diferentes tipos de defesa chamado imunidade inata, sendo contrário aos vertebrados que possuem um sistema adaptativo (Iwanaga e Lee, 2005). Assim como todos os invertebrados, os crustáceos apresentam imunidade inata, também conhecida como inespecífica, a qual seria a primeira linha de defesa destes organismos (Bols et al., 2001; Lee e Söderhäll, 2002), além do exoesqueleto, que funciona como uma barreira física protetora contra agressões e invasão de patógenos (Barraco, et al., 2008).

As reações de defesa dos invertebrados, aqui se inclui os camarões, que mantém a integridade corpórea através de seu sistema imunológico, estão relacionadas a sua hemolinfa, composta por uma fração celular, os hemócitos, e uma humoral, o plasma (Barraco et al., 2008).

Na hemolinfa, esses componentes têm funções no metabolismo de carboidratos, transporte e armazenamento de lipoproteínas e aminoácidos, reparo de lesões e injúrias, coagulação e defesa contra invasão de microrganismos e parasitas (Smith e Soderhäll, 1983). E ainda, como mecanismos de defesa próprio dos crustáceos podem-se citar a coagulação, a melanização, mediada pelo sistema pró-fenoloxidase (proPO), reconhecimento e aglutinação celular, mediada pelas lectinas,

ação antibacteriana, antifúngicos e antivirais, mediados por peptídeos, RNA de interferência (receptores *Toll-like*) e por proteínas de reconhecimento padrão, além da produção de espécies reativas de oxigênio e sistema fagocítico e de encapsulamento (Iwanaga e Lee, 2005). Dessa forma, os crustáceos mesmo não produzindo anticorpos e sem dispor de uma memória imune, apresentam mecanismos suficientes para se proteger de microrganismos invasores. Segundo Bachère et al. (2004) o ambiente aquático no qual o camarão vive dispõe de uma gama de microrganismos, protozoários, microalgas, fungos, leveduras e bactérias. Concomitante a isso estes animais entram em contato direto com alguns deles, como os que constituem a microflora interna dos mesmos e vivem como comensais, e à vista disso os animais desenvolveram maneiras de distinguir os microrganismos benéficos daqueles que poderiam ser nocivos ou patogênicos.

Estes animais quando em seu habitat natural devem estar em equilíbrio com o meio ambiente e o sistema imune, pois assim ele será capaz de manter as infecções sob controle. Entretanto, este cenário é pouco visto nos meios de produção aquícola, onde os animais são submetidos a um meio estressante e com condições ambientais que dificultam sua homeostase, como: alta densidade populacional, diminuição da qualidade da água, desequilíbrio nutricional, sendo todos fatores que levam ao aparecimento de doenças (Bachère et al., 2004).

Devido às condições de desequilíbrio que frequentemente acometem os meios de produção, é comum ver a diminuição na disponibilidade de oxigênio dissolvido, que conseqüentemente dificulta o desempenho metabólico no camarão e pode reduzir o crescimento e a frequência de muda (Aquacop et al., 1988; Allan & Maguire, 1991) e causar mortalidade (Madenjian et al., 1987). Entretanto, os crustáceos apresentam diversas repostas adaptativas à hipóxia, já comentadas, como a redução da taxa metabólica (Hill et al., 1991), modificações do equilíbrio ácido-base da hemolinfa, capacidade de ligação da hemocianina, da proteína da oxi-hemocianina, alteração da pressão osmótica da hemolinfa e das concentrações iônicas (Charmantier et al., 1994; Chen e Kou, 1998).

Para manter a homeostase fisiológica em resposta as condições ambientais desfavoráveis, cada espécie de crustáceo desenvolveu seus próprios mecanismos adaptativos específicos, incluindo respostas comportamentais e fisiológicas, para lidar com as flutuações do oxigênio dissolvido do meio ou mesmo com condições hipóxicas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Contribuir com o fortalecimento da carcinicultura marinha através do entendimento do efeito de baixas concentrações de oxigênio dissolvido sobre o desempenho de *Litopenaeus vannamei*.

1.2.2 Objetivo Específico

- Avaliar a influência da hipóxia no desempenho zootécnico em juvenis de *L. vannamei*;
- Avaliar a influência da hipóxia no sistema imune de *L. vannamei* em condições de cultivo.

2 ARTIGO. Desempenho zootécnico e imunocompetência de juvenis de *Litopenaeus vannamei* submetidos à hipóxia

O artigo será enviado para publicação na revista “Aquaculture”, tendo sido redigido segundo normas da referida revista científica. Conceito B1 no qualis da Capes, área zootecnia e recursos pesqueiros.

DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E IMUNOCOMPETÊNCIA DE JUVENIS DE *Litopenaeus vannamei* SUBMETIDOS À HIPÓXIA

Mirelli Karlla da Silva Sousa Bruno*, Patrícia Santos Melo, Cristhiane Guertler, Walter Quadros Seiffert, Luis Vinatea.

Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Autor para correspondência. E-mail: mirellibruno@gmail.com

RESUMO

Nas fazendas de camarão diariamente é visto a oscilação dos níveis de oxigênio dissolvido e associado a realidade nos meios de produção vê-se a expansão dos ambientes hipóxicos, entretanto, constatou-se que os camarões desenvolveram mecanismos fisiológicos que melhoram sua capacidade de se adaptar e sobreviver a estes episódios de hipóxia. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes níveis de saturação de oxigênio (30%, 50% e controle) em sistema de água clara no desempenho zootécnico e parâmetros imunes de juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. O experimento foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos-UFSC entre os meses de março e abril de 2016 durante 32 dias. Os juvenis com peso médio de $7,0 \pm 0,21$ g foram colocados em aquários contendo 60 L de água, com renovação diária total. A temperatura foi ajustada em $28,0 \pm 0,16^\circ\text{C}$, salinidade 25‰ e pH 8,0. Em todos os tratamentos os parâmetros de qualidade da água, tais como a concentração de oxigênio e a temperatura, foram registrados a cada duas horas; já amônia total e o nitrito (mg.L^{-1}), foram mensurados semanalmente. Ao final do período experimental foi realizada a coleta da hemolinfa para análise dos parâmetros imunes e, por fim, os animais foram contados e pesados. O tratamento com saturação de 50% apresentou os melhores resultados principalmente no peso final, ganho de peso semanal e taxa de crescimento específico. A conversão alimentar aparente não variou estatisticamente e os valores alcançados nos tratamentos estão dentro dos padrões de cultivos atuais. A sobrevivência foi melhor nas saturações de oxigênio acima de 50%. Quanto aos imunoparâmetros que incluem a contagem total de hemócitos (CTH), fenoloxidase (PO), concentração proteica no soro (CP) e atividade aglutinante do soro não diferiram estatisticamente, para as espécies reativas de oxigênio (ERO's) que variou estatisticamente entre o controle e a saturação de 50% para o grupo que não utilizou indutor, houve um aumento gradual, os testes indicaram que estes animais passaram por momentos de estresse, o que poderia indicar que tal situação aumenta a defesa antioxidante dos camarões. Demonstrou-se que os animais se adequaram as condições e que os efeitos da hipóxia parecem diminuir ao longo do tempo, sugerindo que os juvenis de *L. vannamei* conseguem se adaptar a baixas saturações de oxigênio.

Palavra-chave: saturação de oxigênio, carcinicultura, camarão branco, parâmetros imunológicos e qualidade da água.

ABSTRACT

In the shrimp farms, the oscillation of the levels of dissolved oxygen and associated with reality in the means of production is seen the expansion of the hypoxic environments, however, it was verified that the shrimp have developed physiological mechanisms that improve their capacity to adapt and survive these episodes of hypoxia. The objective of this work was to evaluate the effect of different levels of oxygen saturation (30%, 50% and control) in a clear water system on the zootechnical performance and immunity parameters of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*. The experiment was conducted at the Marine Shrimp Laboratory-UFSC between March and April 2016 for 32 days. Juveniles with a mean weight of 7.0 ± 0.21 g were placed in aquaria containing 60 L of water, with total daily renewal. The temperature was adjusted to 28.0 ± 0.16 °C, salinity 25 ‰ and pH 8.0. In all treatments, water quality parameters, such as oxygen concentration and temperature, were recorded every two hours; Total ammonia and nitrite (mg.L⁻¹) were measured weekly. At the end of the experimental period the hemolymph was collected to analyze the immune parameters and, finally, the animals were counted and weighed. The treatment with saturation of 50% presented the best results mainly in the final weight, weekly weight gain and specific growth rate. The apparent feed conversion did not change statistically and the values reached in the treatments are within the current crop standards. Survival was better at oxygen saturations above 50%. As for the immunoparameters that included total hemocyte count (CTH), phenoloxidase (PO), serum protein concentration (CP) and serum binding activity did not differ statistically, for the reactive oxygen species (ROS) which varied statistically between the control and the 50% saturation for the group that did “not use inductor”, there was a gradual increase, the tests indicated that these animals went through moments of stress, which could indicate that such situation increases the antioxidant defense of the shrimps. The animals were shown to be adequate and the effects of hypoxia appear to decrease over time, suggesting that *L. vannamei* juveniles can adapt to low oxygen saturations.

Key words: oxygen saturation, shrimp farming, white shrimp, immunological parameters and water quality.

1.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o *L. Vannamei* é a única espécie de camarão marinho cultivado no Brasil (Santos, 2014). A região que tem destaque na produção dessa espécie é o nordeste, mais especificamente os estados do Ceará e Rio Grande do Norte com uma produção média de quase 50 mil toneladas de camarão cultivado (ABCC, 2013). As fazendas de cultivo do camarão marinho utilizam o sistema bifásico de cultivo, em que há o desenvolvimento da fase de berçário e engorda; através do método de cultivo semi-intensivo onde é visto a oferta de alimento artificial que complementa o natural, densidades populacionais na média de 30 camarões/m² e em algumas fazendas é visto o uso de aeração mecânica nos horários críticos (Pontes, 2006; Santos, 2014).

Na carcinicultura tradicional brasileira alguns indicadores mostram que a maioria dos produtores não detém de grandes avanços nos meios de produção, fato observado através de um levantamento nas fazendas de camarão, onde na sua maioria os cultivo eram compostos por micro produtores (717 indivíduos) em contraste com os grandes (76 indivíduos), desses 9% realizavam análises de parâmetros de qualidade da água, quanto a presença de tanques berçários intensivos somente 2% tinham implantado esse sistema, quanto ao uso de aeradores 31% tinham acesso e usufruíam quando necessário (ABCC, 2013), ou seja, a realidade vivenciada pela maioria dos produtores brasileiros ainda precisa ser melhorada e alternativas que minimizem as perdas econômicas da atividade precisam ser implementadas.

Um dos principais parâmetros da qualidade da água na aquicultura é o oxigênio dissolvido (OD), considerado limitante da intensificação da carcinicultura (Sun et al., 2016). O valor ideal de OD na água está em torno de 4-5 mg.L⁻¹, recomendado para cultivos intensivos (Cheng et al., 2003) a fim de garantir as atividades vitais dos animais. Em contrapartida, Diaz e Rosenberg (1995) demonstraram que situações de baixa oxigenação é definida com o OD menor que 2,8 mg.L⁻¹.

Nas fazendas de camarão diariamente é visto a oscilação dos níveis de oxigênio dissolvido e associado a realidade nos meios de produção em que nem todos os produtores tem acesso a meios tecnológicos como aeradores mecânicos ou mão de obra qualificada para controle de parâmetros de qualidade da água e do solo, é visto a expansão dos ambientes hipóxicos (áreas de baixa oxigenação).

Vários autores tem descrito os efeitos que a hipóxia têm sobre o crescimento, a sobrevivência, a alimentação, a muda, o comportamento natatório, a capacidade osmorregulatória e a resposta imune dos camarões

peneídeos (Clark, 1986; Allan e Maguire, 1991; Charmantier et al., 1994; Le Moullac et al., 1998; Wannamaker e Rice, 2000; McGraw et al., 2001; Wu et al., 2002; Pérez-Rostro et al., 2004; Mugnier e Soyez, 2005).

Em geral, os organismos aquáticos são reguladores e/ou conformadores de oxigênio dependendo da sua capacidade para alterar o metabolismo em função da concentração de oxigênio dissolvido na água (Thomas, 1954; Wolverkamp e Waterman, 1960; McMahon, 2001). Camarões que habitam áreas com forte flutuação de oxigênio desenvolvem mecanismos fisiológicos que melhoram a sua capacidade de lidar com episódios de hipóxia (Airries e McMahon 1994; McMahon 2001).

Os efeitos do oxigênio dissolvido em camarões têm sido bem relatado, principalmente nas condições de hipóxia. Entretanto, ainda é escasso o número de pesquisas sobre os efeitos das baixas concentrações de oxigênio sobre o crescimento, sobrevivência e a resposta imune em camarões. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da hipóxia no crescimento, sobrevivência e parâmetros imunológicos de juvenis de *Litopenaeus vannamei*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Origem dos animais e condições de aclimação

O experimento foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) localizado em Florianópolis, Santa Catarina, entre os meses de março e abril de 2016. Os juvenis de *Litopennaeus vannamei* ($7,0 \pm 0,21$ g) utilizados neste estudo eram mantidos neste laboratório sob condições de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidade de 35‰ e a concentração de oxigênio maior que $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Os camarões utilizados foram transferidos para tanques de 10 000 L de fibra de vidro. Antes de se começar o experimento foram retirados 9 animais para a coleta de hemolinfa. O restante dos animais foram submetidos a um período de aclimação de 48 horas com oxigenação constante e superior a $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para se alcançar a salinidade desejada de 25‰, foi feita uma diluição gradual da água do mar com água doce, na proporção de 5‰ por dia (McFarland e Lee, 1963). Uma vez aclimatados, os animais foram selecionados aleatoriamente para as unidades experimentais composta por aquários de vidro ($0,28 \text{ m}^2$) à razão de 15 camarões por aquário, que foram mantidos em sistema de água clara (troca de água diária), respeitando uma ocupação máxima de um animal para quatro litros de água (Le Moullac et al., 1998; Jiang et al., 2005).

2.2.2 Condições experimentais

Os camarões foram expostos durante 32 dias a duas concentrações de oxigênio dissolvido (tratamentos): 2,09 mg.L⁻¹ DO (~30%) e 3,42 mg. L⁻¹ DO (~50%) e o grupo controle em que a saturação de oxigênio se manteve acima de 4,78 mg.L⁻¹ DO. A salinidade de 25‰, temperatura de 28 ± 1°C. Cada tratamento contou com três repetições simultâneas, totalizando 9 unidades experimentais.

Foi utilizado um sistema semelhante ao descrito por Seidman e Lawrence (1985) e Allan e Maguire (1991) para se conseguir as concentrações de oxigênio desejadas. Os nove aquários com 60 litros de água eram interligados a um sistema de aeração composto por duas redes de ar, a primeira fornecia ar pressurizado por um soprador, distribuído por um conjunto de mangueiras para os 9 aquários com controle individual de fluxo. A segunda rede distribuiu nitrogênio; junto a esta rede estava interligado um regulador e um medidor de vazão de nitrogênio. O nível de saturação desejado foi alcançado pelo borbulhamento de nitrogênio (Jiang et al., 2005) até próximo a saturação requerida, e pelo consumo dos animais (Le Moullac et al, 1998; Mugnier & Soyez, 2005). A manutenção da saturação de oxigênio era obtida pelo fluxo de ar controlado e pela manutenção de uma lâmina de isopor de 5mm e uma lâmina de E.V.A. (Etileno Vinil Acetato) sobre a água. O isopor e a lâmina restringiam as trocas gasosas com a atmosfera pela diminuição da interface ar-água.

2.2.3 Procedimento experimental

Os camarões foram alimentados duas vezes ao dia (08:00 e 14:00 h) na proporção de 3% da biomassa, sendo ajustada semanalmente. O alimento não ingerido, as fezes e as mudas foram removidos de cada aquário por sifonamento, juntamente com troca de 70% da água, tanto de manhã como pela tarde (renovação de 140% ao dia), para essa renovação era mantido um “tanque pulmão” com capacidade para 500 L de água, em que era feito a diluição da água para a salinidade utilizada (25‰) e a adequação da temperatura em 28 °C e posteriormente era feito a diminuição na saturação de oxigênio de acordo com o aquário que seria abastecido. A temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido foram medidas a cada duas horas durante o dia e a cada três horas à noite. A salinidade foi medida duas vezes ao dia (08:30 e 18:00 h) com um multiparâmetro YSI – *Professional Series*, e a amônia e o nitrito uma vez por semana pelo método do azul de indofenol (Strickland e Parsons, 1972).

Após 32 dias de experimento, foi feita a coleta da hemolinfa de 3 camarões de cada aquário. No final do experimento os camarões foram contados e pesados em uma balança digital para determinar a sobrevivência e o ganho de peso.

2.2.4 Desempenho zootécnico

O desempenho zootécnico foi determinado através dos seguintes parâmetros: peso médio final (g), ganho de peso semanal [(peso médio final – peso médio inicial)/semanas de cultivo], sobrevivência [(número final de camarões/número inicial de camarões) x 100], fator de conversão alimentar aparente (alimento ofertado em gramas/biomassa final em gramas), taxa de crescimento específico [$100 \times (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{dias de cultivo}$], biomassa (peso final x número final de indivíduos).

2.2.5 Parâmetros hemato-imunológicos

2.2.5.1 Coleta de hemolinfa para preparação do soro

Para obtenção do soro, a hemolinfa dos camarões de cada tratamento (n=9 para cada grupo) foi coletada através de uma seringa resfriada (1 ml) com agulha (13 x 0,4mm), inserida na região ventral do primeiro segmento.

2.2.5.2 Contagem total de hemócitos

As estimativas da contagem total de hemócitos (CTH) foi realizada em câmara de Neubauer. A hemolinfa coletada do seio ventral dos camarões (3 animais por grupo) com uma seringa de 1 ml com solução fixadora constituída de 4% de formaldeído em solução anticoagulante MAS (Solução de Alsever modificada: 27mM citrato de sódio, 336 mM cloreto de sódio, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7,0) numa diluição conhecida.

2.2.5.3 Atividade da enzima fenoloxidase (PO) no soro

A determinação da atividade da PO nas amostras de soro foi realizada espectrofotometricamente (490 nm), pela formação do pigmento vermelho coral DOPA-cromo, proveniente da oxidação do

substrato enzimático L-DOPA pela PO do soro. Amostras de 50 µL do soro previamente diluídas (15 x) em TBS (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 330 mM NaCl, pH 7,6) e uma alíquota de 50 µL dessa solução foi pré-incubada com um volume igual do indutor enzimático tripsina (Sigma, 1mg/ml) por 5 min à temperatura ambiente em microplacas de 96 poços (fundo chato). Após incubação, adicionou-se 50 µL de L-DOPA (3mg/ml) e a formação do pigmento DOPA-cromo foi quantificado em leitor de microplacas na absorbância de 490 nm e monitorado após 5, 10 e 15 min. A atividade enzimática da PO foi expressa pela variação da absorbância por minuto e por miligrama de proteínas totais nas amostras. Os testes foram realizados em triplicata.

2.2.5.4 Determinação do título aglutinante do soro

Na determinação do título de aglutininas/lectinas, inicialmente foi colocado 50 µL de uma solução TBS (50 mM Tris, 5mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 150mM NaCl, pH 7,4) em todos os poços de uma microplaca (fundo “U”). Logo depois adicionou-se no primeiro poço 50 µL do soro previamente diluído (16x) em TBS, seguindo-se de uma diluição seriada nos poços subsequentes. Ao final, 50 µL de uma solução de eritrócitos de cão a 2% (em NaCl 0,15 M) foram adicionados em cada poço e a mistura incubada por 2h em câmara úmida à temperatura ambiente. Nos controles, o soro dos camarões foi substituído por TBS. O título aglutinante do soro foi expresso como o recíproco da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

2.2.5.5 Concentração de proteínas totais no soro (CP)

A concentração proteica do soro (3 pools de 3 animais por grupo) foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovina (BSA) como proteína padrão. Para isso, 20 µL de soro (diluído 6000x em água milliQ) foi colocado em poços de uma microplaca (fundo chato) e acrescidos de 200 µL de solução de Bradford. Foi então incubado por 15 minutos, à temperatura ambiente e a CP determinada após mensurar a absorbância (595 nm), em leitor de microplacas. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.2.5.6 Quantificação da produção intracelular de ânions superóxidos

A produção de ânion superóxido (O₂⁻) pelos hemócitos foi quantificada pelo método de redução do NBT (*nitro-blue-tetrazolium*) de

acordo com o método adaptado de Guertler et al., 2010. Como ativador celular foi usado a Laminarina (β -1,3 glicanas). A hemolinfa foi coletada em solução anticoagulante (400 nM ácido cítrico, pH 5,5) centrifugada a 800 x g, por 10 minutos a 4 °C e os hemócitos recuperados e ressuspendidos em solução salina (SS-P: 5,4 mM KCl, 2,6 mM MgCl₂, 3mM CaCl₂, 400 mM NaCl, 2mM NaHCO₃, pH 7,6). Logo depois, 100 μ L da suspensão de hemócitos ($2,5 \times 10^6$ cél/mL) foram depositados nos poços de uma microplaca estéril de 96 poços (fundo chato) para adesão celular. As monocamadas celulares foram lavadas com SS-P e adicionou-se um volume de 100 μ L contendo o NBT a 0,3% e o indutor (concentração final: laminarina 2 mg.mL⁻¹). As monocamadas controle receberam NBT e SS-P ou apenas SS-P (branco), sem indutor. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram fixadas com metanol absoluto. Após secagem, adicionou-se KOH 2M e DMSO para solubilizar o precipitado azul de formazan produzido. A produção do pigmento púrpura (formazan), gerado pela redução do NBT pelos ânions superóxidos produzidos, foi então quantificada em uma leitora de microplacas a 630nm. Todos os testes foram feitos em triplicata.

2.2.6 Análise estatística

Os dados foram testados utilizando o software Statistic 7.0 e submetidos à análise de variância – ANOVA. Uma vez encontrada diferenças entre as médias, foi utilizado o teste de Tukey para separação de médias ($p < 0,05$).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Parâmetros de qualidade da água

Os cuidados com os parâmetros de qualidade da água na manutenção dos níveis ideais pré-estabelecidos tem sua importância, visto que é comprovado que fatores físicos e químicos podem intervir no consumo alimentar e no processo de crescimento (Santos, 2014). Em todos os tratamentos a qualidade da água permaneceu no intervalo seguro para os camarões (Boyd e Gautier, 2000), não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$). Os valores mantidos foram os seguintes, temperatura 28,15 °C, salinidade 25‰, pH: 8,0, amônia 0,5 mg.L⁻¹ e nitrito foi zero. A concentração média de oxigênio foi mantida em tratamento 30% = 2,09 mg.L⁻¹, 50% = 3,42 mg.L⁻¹ e controle com concentrações próximos a 5 mg.L⁻¹.

2.3.2 Parâmetros zootécnicos

O peso inicial dos camarões não foi significativamente diferente entre os tratamentos. O peso final diferiu estatisticamente entre a saturação de 30% e o grupo controle (tabela 1). O ganho de peso semanal, diferiu estatisticamente, sendo os melhores resultados para os tratamentos com saturação de oxigênio acima de 50%. A taxa de crescimento específico, variou estatisticamente, com a saturação de 30% diferindo do controle.

Este resultado foi similar ao mostrado por Nonwachai et al. (2011) em estudo com hipóxia e por Seidman e Lawrence (1985) que relataram que concentrações de oxigênio dissolvido abaixo de 2 mg.L^{-1} reduzem significativamente a taxa de crescimento de *Penaeus vannamei* e *Penaeus monodon*. Como também visto por Mugnier e Soyez (2005) os camarões apresentaram uma resposta máxima ao estresse após 6 horas de exposição a baixa concentração de OD, e essa resposta pareceu ser mantida após exposição de 24 horas. No entanto, este efeito negativo tendeu a diminuir com o tempo, após exposição de 48 horas, possivelmente porque os camarões se adaptaram parcialmente à baixa concentração de OD.

Ao mesmo tempo, muitos registros indicam que o camarão cultivado fora do seu ponto de equilíbrio tende a consumir mais alimento para compensar as perdas energéticas da osmorregulação e adaptar-se às condições (Rosas et al., 2001; Hurtado et al., 2006) e, conseqüentemente, gasta mais energia para a regulação interna e menos para o crescimento (Hurtado et al., 2006).

A conversão alimentar aparente não diferiu estatisticamente e esteve dentro da média de cultivos como visto por Santos et al. (2014) em fazendas de camarão no nordeste do Brasil, em que o fator de conversão alimentar médio foi de 1,73 e demonstrou-se que esta variável sofre forte influência do tempo de cultivo e da densidade de estocagem. Já Allan e Maguire (1991) após 21 dias de experimento com *P. monodon*, com estresses de hipóxia na média de 1 mg.L^{-1} com duração de 12 h diárias, observaram que o fator de conversão alimentar quando comparado ao controle (1,5), foi menor (1,3) a medida que se diminuiu a concentração de oxigênio do ambiente, e, dessa maneira, não observaram qualquer redução no crescimento durante o período experimental de quando os animais são submetidos a uma única condição de estresse agudo.

Os camarões do gênero *Penaeus* exibem mecanismos compensatórios para preservar o crescimento, independente da concentração de OD e isso pode ser visto como um reflexo da energia

utilizada para o movimento muscular geral e a atividade cardíaca, bem como para a regulação interna e movimento do escafnogonito, entre outros (Findley et al., 1978, Houlihan et al., 1985, Rosas et al., 1989).

Rosas (1999) em trabalho com juvenis de *P. setiferus* observou que os mesmos podiam alterar seu substrato metabólico em função da salinidade e do OD, e esta alteração poderia estar relacionada a uma possível estratégia dos organismos para absorver o máximo de energia a partir das proteínas. Ainda segundo o autor, a proporção de energia assimilada direcionada à respiração diminui em função do nível de OD, e, em contrapartida, a quantidade de energia assimilada é direcionada para a produção, a qual aumenta em relação à redução da concentração do oxigênio dissolvido quando os camarões foram expostos a níveis de OD abaixo de 4 mg.L⁻¹.

A sobrevivência dos animais não diferiu estatisticamente, entretanto, sugeriu que saturações de oxigênio menores que 2,09 mg.L⁻¹ (30%) afeta severamente a sobrevivência dos camarões, fato este também demonstrado por Nonwachai et al. (2011) onde foi apresentado que concentrações de oxigênio menores que 2 mg.L⁻¹ a sobrevivência foi de pouco mais de 50%. Santos et al. (2014) em levantamento em uma fazenda de produção do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* viram que a sobrevivência média foi de pouco mais de 70% e que esta situação era influenciada pelas condições de cultivo quando ligadas a altas densidades e ao tempo de cultivo. A biomassa final não diferiu estatisticamente entre os grupos (p>0,05).

Tabela 1: Parâmetros zootécnicos dos juvenis de camarões (*Litopenaeus vannamei*) nas diferentes saturações de oxigênio durante 32 dias em água clara; médias (\pm desvio-padrão) do peso final (PF), ganho de peso semanal (GPS), taxa de crescimento específico (TCE), fator conversão alimentar aparente (FCA), sobrevivência (%) e biomassa (g).

Variáveis	Tratamentos		
	30%	50%	Controle
Peso final (g)	9,89 \pm 0,62 ^b	10,06 \pm 0,65 ^{ab}	10,42 \pm 0,57 ^a
GPS (g/semana)	0,65 \pm 0,17 ^c	0,76 \pm 0,16 ^b	0,87 \pm 0,15 ^a
TCE (%)	0,94 \pm 0,22 ^b	1,12 \pm 0,23 ^{ab}	1,27 \pm 0,18 ^a
FCA	1,21 \pm 0,13	1,15 \pm 0,06	1,09 \pm 0,15
Sobrevivência (%)	62,2 \pm 13,88	75,5 \pm 3,85	77,7 \pm 10,18
Biomassa (g)	92,53 \pm 21,54	114,05 \pm 6,20	121,64 \pm 15,96

Os valores apresentados são as médias de três repetições \pm desvio padrão. a, b e c: letras diferentes demonstram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste Tukey.

2.3.3 Imunoparâmetros

A contagem total de hemócitos (CTH) não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) entre os grupos e o controle ($31,53 \pm 4,70$ células/mm³) (Figura 1a). Viu-se uma diminuição na contagem total de hemócitos, quando comparado ao controle, e situação semelhante foi descrito por Nonwachai et al. (2011) em 60 dias de experimento com a mesma espécie, os tratamentos com concentração de oxigênio abaixo de 4mg.L^{-1} sofreram uma diminuição da contagem de hemócitos e observou a adaptação dos camarões a longos períodos de hipóxia, em outra situação como o testado por Lehmann et al. (2016) em que camarões foram cultivados em três diferentes saturações de oxigênio e infectados com o vírus da mancha branca foi visto que em 48 horas houve uma diminuição da contagem total de hemócitos, indicando situação de estresse.

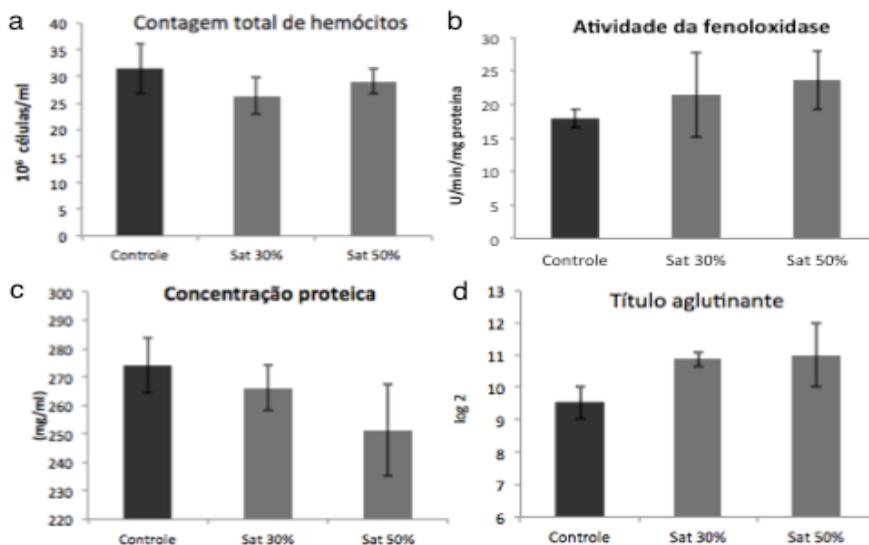
A atividade da fenoloxidase (PO) não variou estatisticamente entre os grupos. Observou-se um aumento nas taxas à medida que a disponibilidade de oxigênio dissolvido era maior (Figura 1b). Alguns autores descrevem que em condições de hipóxia situações semelhantes também foram constatadas, como Jiang et al (2005) em que camarões da espécie *L. vannamei* foram expostos a concentrações de oxigênio de 3,5 e 2,0 mg.L^{-1} e observou-se que a atividade da fenoloxidase aumentou significativamente, enquanto, Le Moullac e Haffner (2000) acrescentam que a atividade da PO aumentou pois a mesma está relacionada com a indução de inibidores do plasma que regulam este sistema de defesa dos organismos.

A concentração de proteínas (CP) no soro não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) (Figura 1c). Normalmente é visto uma redução na concentração proteica quando o animal vivencia alguma situação de estresse. Chen et al. (1994) com *P. monodon* observou baixas taxas na concentração proteica para camarões expostos a baixas salinidades. Já Perazollo (2002) sugere que estas práticas são estressantes para os organismos, sendo a concentração proteica um excelente indicador de estresse, podendo ser utilizado para monitorar a saúde dos camarões.

A determinação do título aglutinante não diferiu estatisticamente entre os grupos (Figura 1d). Quando ocorre um aumento do título aglutinante demonstra-se uma crescente capacidade de reconhecimento das proteínas, como as lectinas, o que indica mais um componente que

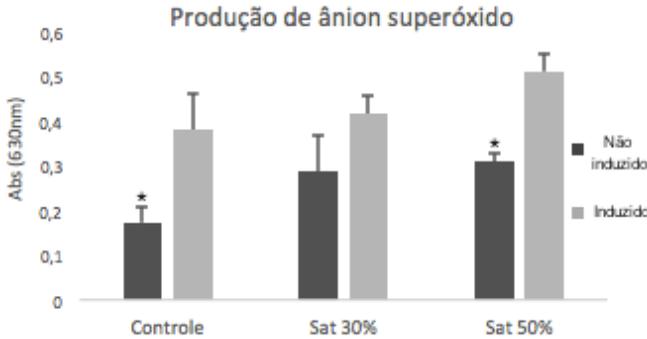
estimula a proteção e defesa presente nos crustáceos (Barraco, 2008). Ferreira et al. (2015) em trabalho com dieta suplementada com probiótico (*Bacillus* spp.) percebeu que as lectinas, que são proteínas de reconhecimento padrão (PRP), aglutinavam células que continham carboidratos em sua composição, assim bactérias (tanto gram-positivas como negativas) eram aglutinadas e algumas até sendo possíveis espécies patogênicas como as do gênero *Vibrio*.

Figura 1: (a) Contagem total de hemócitos (CTH); (b) Atividade da fenoloxidase (PO); (c) Concentração de proteínas totais no soro (CP) e (d) Determinação do título aglutinante do soro de camarões em diferentes saturações de oxigênio.



Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos está determinado por um asterisco (*).

Figura 2: Quantificação da produção intracelular de ânions superóxido estimulado pelo indutor laminarina de camarões cultivados em diferentes saturações de oxigênio.



Diferenças significativas ($p < 0,05$) nos tratamentos estão sendo identificadas por asteriscos (*).

A quantificação da produção intracelular de ânions superóxido apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o controle e a saturação de 50% para o “não-induzido” (Figura 2). A laminarina foi o indutor utilizado para avaliar o efeito da hipóxia na atividade fagocitária.

Observa-se um aumento na produção dos ânions superóxidos de acordo com os tratamentos, Le Moullac (1998) com camarões em condições de hipóxia, em que houve um aumento na produção de radicais superóxidos, além de observar uma relação com um aumento no número de hemócitos. Esta capacidade dos hemócitos de produzir ERO's pode ser considerado um bom parâmetro para avaliar a imunidade animal. Li et al. (2006) e Parrilla-Taylor e Zenteno-Savín (2011) afirmaram que a hipóxia aumenta a defesa antioxidante dos animais.

Os parâmetros mensurados com *Litopenaeus vannamei* para imunidade apresentaram valores que condizem com a situação instável vivenciada. Os animais que estavam nas baixas saturações demonstraram uma adaptação parcial acompanhado da baixa alteração de seus parâmetros imunes ao contrário dos camarões das saturações mais elevadas em que estes sentiram mais efetivamente a instabilidade do ambiente, entretanto em todos os tratamentos é visto uma capacidade de adaptação das respostas fisiológicas quando são expostos a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido.

2.4 CONCLUSÃO

Nos meios de cultivo tradicionais a oscilação diária dos parâmetros químicos e físicos podem abrir portas à entrada de agentes estranhos ao meio e com a presença de situações de baixa oxigenação isso pode ser agravado trazendo perdas ao sistema. A resposta do *Litopenaeus vannamei* as condições testadas demonstram uma capacidade de adequação a diversas condições, principalmente ao apresentado nas baixas saturações de oxigênio, em que o animal aparentemente reduziu seu metabolismo para se adequar a situação de hipóxia. Entretanto, foi visto que nas concentrações de oxigênio dissolvido acima de 50% parâmetros como crescimento, sobrevivência e imunidade foram significativamente melhores.

2.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado fornecida a aluna Mirelli Karlla da S. S. Bruno, ao Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) e ao Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina pelo suporte técnico e infraestrutura cedida.

2.6 REFERÊNCIAS

ABCC. 2013. Levantamento da infraestrutura produtiva e dos aspectos tecnológicos, econômicos, sociais e ambientais da carcinicultura marinha no Brasil em 2011. Convenio ABCC/MPA: nº 756578/2011. Natal, Rio Grande do Norte, Abril, 74p.

Airriess, C.N., McMahon, B.R., 1994. Cardiovascular adaptations enhance tolerance of environmental hypoxia in the crab *Cancer magister*. J. Exp. Biol., v. 190, p. 23–41.

Allan, G.L., Maguire, G.B., 1991. Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *Penaeus monodon*. Aquaculture, v. 94, p. 27–37.

Barracco, M.A., Perazzolo, L.M., Rosa, R.D. 2008. Inmunologia de crustáceos, con énfasis en camarones. In: Morales, V. Patología e Inmunologia del camarón blanco *Penaeus vannamei*, Panamá: CYTED, 2008, p.169-224.

Boyd, C.E., Gautier, D. 2000. Effluent composition and water quality standards. *Global Aquaculture Advocate.*, v.3, p. 61-66.

Charmantier, G., Soyez, C., Aquacop, 1994. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 178, p. 233–246.

Chen, J.C., Chen, C.T., Cheng, S.Y., 1994. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambiente ammonia-N at different salinity levels. *Mar. Ecol., Prog. Ser.*, v. 110, p. 85–94.

Cheng, W., Liu, C.H., Kuo, C.M. 2003. Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture*, v. 220, p. 843–856.

Clark, J.V., 1986. Inhibition of moulting in *Penaeus semisulcatus* (De Haan) by long-term hypoxia. *Aquaculture*, v. 52, p. 253–254.

Diaz, J.R., Rosenberg, R., 1995. Marine benthic hypoxia: a review its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanogr. Mar. Biol., Annu. Rev.*, v. 33, p. 245–303.

Ferreira, G. S., Bolívar, N.C., Pereira, S.A., Guertler, C., Vieira, F.N., Mourinho, J.L.P., Seiffert, W.Q. 2015. Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 448, p. 273-279.

Findley, A. M., Belisle, B. W. e Stickle, W. B. 1978. Effect of salinity fluctuations on the respiration rate of south oyster drill *Thais haemastoma* and the blue crab *Callinectes sapidus*. *Mar. Biol.*, 49, 59-67

Guertler, C., Schleder, D.D., Barraco, M.A., Perazzolo, L.M. 2010. Comparative study of the intracellular superoxide anion production in diferente penaeid species through the NBT- reduction assay. *Aquaculture Research*, 41, 1082-1088.

Houlihan, D. F., Govind, C. K. e El Haj, A. 1985. Energetics of swimming in *Callinectes sapidus* and walking in *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 267-279.

- Hurtado, M.A., Racotta, I., Arjona, O., Hernández-Rodríguez, M., Goytortúa, E., Civera, R., Palacios, E. 2006. Effect of hypo- and hyper-saline conditions on osmolarity and fatty acid composition of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) fed low- and high-HUFA diets. *Aquac. Res.*, Oxford, v. 37, n 13, p. 1316-1326.
- Jiang, L.; Pan, L.; Fang, B. 2005. Effect of dissolved oxygen on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 18, p. 185-188.
- Lehmann, M., Schleder, D.D., Guertler, C., Perazzolo, L.M., Vinatea, L. 2016. Hypoxia increases susceptibility of Pacific White shrimp to white spot syndrome virus (WSSV). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.68, p. 1-7.
- Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C., Levy, P. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 8, p. 621–629.
- Le Moullac, G., Haffner, P., 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*, v. 191, p. 121–131.
- Li, Y., Wang, Q. 2006. The effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on growth and non-specific immunity factors in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture*, v. 256, p. 608-616.
- McFarland, W.N. & Lee, B. D. 1963. Osmotic and ionic concentrations of Penaeidean shrimps of the Texas coast. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean*, v.13, n. 3, p. 391-417.
- McGraw, W., Teichert-Coddington, D.R., Rouse, D.B., Boyd, C.E., 2001. Higher minimum dissolved oxygen concentrations increase penaeid shrimp yields in earthen ponds. *Aquaculture*, v. 199, p. 311–321.
- McMahon, B.R., 2001. Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustaceans respiration. *Physiology*, v. 128, p. 349–364.
- Mugnier, C., Soyez, C., 2005. Response of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* to temperature decrease and hypoxia in relation to molt stage. *Aquaculture*, v. 244, p. 315–322.

Nonwachai, T., Purivirojku, W., Chuchird, N. e Limsuwan, C. 2011. Effects of dissolved oxygen levels on growth, survival and immune response of juvenile Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei*. Kasetsart University Fisheries Research Bulletin. v. 35, n.2.

Parrilla-Taylor, D., Zenteno-Savín, T., Magallon, F.J. 2013. Antioxidant enzyme activity in pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to infection with White spot syndrome virus. Aquaculture, v. 380 -388, p. 41-46.

Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barraco, M.A.A. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. Aquaculture, v. 214, p. 19-33.

Pérez-Rostro, C.I., Racotta, I.S., Ibarra, A.M., 2004. Decreased genetic variation in metabolic variables of *Litopenaeus vannamei* shrimp after exposure to acute hypoxia. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., v. 302, p. 189–200.

Pontes, C. S. 2006. Padrão de deslocamento do camarão marinho I (Boone) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) nas fases clara e escura ao longo de 24 horas. *Rev. Bras. Zool.*, 23(1): 223- 227.

Rosas, C., Barrera, G. e Lazaro-Chavez, E. 1989. Effect of salinity and seasonal temperature fluctuations in oxygen consumption of *Callinectes rathbunae* Contreras and *Callinectes similis* Williams (Crustacea, Portunidae). *Tropical Ecol.* v. 30, p. 1-12.

Rosas, C., Martínez, E., Gaxiola, G., Brito, R., Sánchez, A., Soto, L.A., 1999. The effect of dissolved oxygen and salinity on oxygen consumption ammonia excretion and osmotic pressure of *Penaeus setiferus* (Linnaeus) juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 234, 41– 57.

Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Le Priol, Y., Pascual, C., Rossignol, J., Contreras, F., Sanchez, A. e Wormhoudt, A.V. 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, Amsterdam, v. 259, n. 1, p. 1-22.

Santos, C.J.A., Santos, D.L., Mendes, P.P. 2014. Uso de modelos matemáticos para avaliação das variáveis de manejo do *Litopenaeus*

vannamei (Boone, 1931). Acta Fish. Aquat. Res., v. 2, n. 2, p.28-39. DOI 10.2312/ActaFish.2014.2.2.28-39

Seidman, E.R., Lawrence, A.L. 1985. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different dissolved oxygen levels. J. World Maricult. Soc., v. 16, p. 333–346.

Sun, S., Xuan, F., Fu, H., Ge, X., Zhu, J., Qiao, H., Jin, S., Zhang, Y. 2016. Comparative proteomic study of response to hypoxia in the muscle of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). Journal of Proteomics, n. 138, p. 115-123.

Thomas, H.J., 1954. The oxygen uptake of the lobster *Homarus Tulgaris* Edw. J. Exp. Biol., v. 31, p. 228–251.

Wannamaker, C.M., Rice, J.A., 2000. Effects of hypoxia on movements and behavior of selected estuarine organisms from the southeastern United States. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., v. 249, p. 145–163.

Wolverkamp, H.P., Waterman, T.H., 1960. Respiration. In: Waterman, T.H. (Ed.), Physiology of Crustacea. Academic Press, New York, v. 1, p. 35–100.

Wu, R.S.S., Lam, P.K.S., Wan, K.L., 2002. Tolerance to, and avoidance of, hypoxia by the penaeid shrimp (*Metapenaeus ensis*). Environ. Pollut., v. 118, p. 351–355.

3. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

AIRRIESS, C.N., McMAHON, B.R. Cardiovascular adaptations enhance tolerance of environmental hypoxia in the crab *Cancer magister*. J. Exp. Biol., v. 190, p. 23–41, 1994.

ALLAN, G.L. & MAGUIRE, G. B. Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-term oxygen stress on subsequent growth of juvenile *Penaeus monodon*. Aquaculture, v. 94, p. 27–37, 1991.

AQUACOP, BÉDIER, E., SOYEZ, C. Effects of dissolved oxygen concentration on survival and growth of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris*. Journal of the World Aquaculture Society, v.19, n.13, 1988.

AVNIMELECH, Y & G, RITVO. Shrimp and fish pond soils: processes and management. *Aquaculture*, 220: 549– 567, 2003.

BACHÈRE, E., GUEGUEN, Y., GONZALEZ, M., LORGERIL, J., GARNIER, J., ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunological Reviews, v. 198, p. 149–68, 2004.

BARRACCO, M.A., PERAZZOLO, L.M., ROSA, R.D. Inmunología de crustáceos, con énfasis en camarones. In: Morales, V. Patología e Inmunología del camarón blanco *Penaeus vannamei*, Panamá: CYTED, 2008, pp.169-224, 2008.

BOLS, N.C., BRUBACHER, J.L., GANASSIN, R.C., LEE, L.E. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Developmental and Comparative Immunology, v. 25, n. 8-9, p. 853–73, 2001.

BOYD, C. E. Water quality in ponds for aquaculture. 482pp, 1990.

BOYD, C. E. & CLAY, J. W. Shrimp Aquaculture and the Environment. Scientific American., p. 59-65, June, 1998.

BURGGREN, W.W., McMAHON, B.R. An analysis of scaphognathite pumping in the crayfish *Orconectes Tirlis*: compensatory changes to acute and chronic hypoxia. Phys- iol. Zool., v. 56, p. 309–318, 1983.

CHARMANTIER, G., SOYEZ, C., Aquacop. Effect of moult stage and

hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 178, p. 233–246, 1994.

CHEN, J.C., KOU, T.T., Hemolymph acid-balance, oxyhemocyanin, and protein levels of *Macrobrachium rosenbergii* at different concentrations of dissolved oxygen. *J. Crustac. Biol.*, v. 18, p. 437–441, 1998.

DIAZ, R.J. & ROSENBERG, R. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioral responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, v. 33, p. 245-303, 1995.

FAST, A. W.; BOYD, C. E. Water circulation, aeration and other management practices. In: *Marine Shrimp Culture: Principles and practices*. Arlo & James Lester (Eds.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam. p. 457-495, 1992.

GANDINI, F. A., NASCIMENTO, J.R.O.,MEDEIROS, C.S., OSHIRO, L.M.Y., SANT'ANA, N. F. Avaliação de diferentes fontes de carboidratos para o sistema de bioflocos e crescimento do camarão branco. *Bol. Inst. Pesca, São Paulo*, v. 42, n. 4, p. 831-843, 2016. Doi: 10.20950/1678-2305.2016v42n4p831

HERNANDEZ, J. Z., NUNES, A. J. P. Biossegurança no cultivo de camarão marinho: qualidade da água e fatores ambientais. *Revista ABCC*. v. 3, n. 2, p 55-59, 2001.

HILL, A. D., TAYLOR, A. C., STRANG, R. H. C. Physiological and metabolic responses of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) during environmental anoxia and subsequent recovery. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 150, p. 31–50, 1991.

IWANAGA, S., LEE, B.L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, n. 2, p. 128–50, 2005.

LEE, S.Y., SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 12, n.5, p. 421–37, 2002.

MADENJIAN, C. M., ROGERS, G. L., FAST, A. W. Predicting night-time dissolved oxygen loss in prawn pond of Hawai'i: part I. Evaluation of traditional methods. *Aquaculture Engineering*, v. 6, p. 191–208, 1987.

MASSABUAU, J.C. The respiratory system of the crayfish: a cross-current system. *J. Physiol. London*, v. 345, 170p, 1983.

MASSABUAU, J.C., BURTIN, B. Regulation of the oxygen consumption in the crayfish *Astacus leptodactylus*: role of the peripheral O₂ chemoreception. *J. Comp. Physiol. B*, v. 155, p. 43–49, 1984.

MCMAHON, B.R., BURGGREN, W.W., WILKENS, J.L. Respiratory responses to long-term hypoxia stress in the crayfish *Orconectes Tirilis*. *J. Exp. Biol.* 60, 195–206, 1974.

MCMAHON, B.R. Factors controlling the distribution of cardiac output in crustaceans. In: HILL, R.B., KUWASAWA, K., MCMAHON, B.R., KURAMOTO, T. (Eds.), *Phylogenetic Models in Functional Coupling of the CNS and the Cardiovascular System*, *Comp. Physiol.*, v. 11, Basel, Karger, p. 51–61, 1992.

MCMAHON, B.R. Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustaceans respiration. *Physiology*, v. 128, p. 349–364, 2001.

NUNES, A. J. Fundamentos da engorda de camarões marinhos. Recife, Guia Purina, 2004.

PONTES, C. S. Padrão de deslocamento do camarão marinho I (Boone) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) nas fases clara e escura ao longo de 24 horas. *Rev. Bras. Zool.*, 23(1): 223- 227, 2006.

REIBER, C.L., MCMAHON, B.R., Progressive hypoxia's effects on the crustacean cardiovascular system: a comparison of the freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*) and the lobster (*Homarus americanus*). *J. Comp. Physiol. B.*, v. 168, p. 68–76, 1998.

RIBEIRO, L.F., SOUZA, M.M., BARROS, F., HATJE, V. Desafios da carcinicultura: aspectos legais, impactos ambientais e alternativas mitigadoras. *Revista de Gestão Costeira Integrada*, v. 14, n. 3, p. 365-383, 2014.

SANTOS, C.J.A., SANTOS, D.L., MENDES, P.P. Uso de modelos matemáticos para avaliação das variáveis de manejo do *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Acta Fish. Aquat. Res., v. 2, n. 2, p.28-39, 2014. DOI 10.2312/ActaFish.2014.2.2.28-39

SMITH, V.J., SODERHALL, K. β -1,3-glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. Biological Bulletin, v. 164, p. 299-314, 1983.

THOMAS, H.J., The oxygen uptake of the lobster *Homarus Tulgaris* Edw. J. Exp. Biol., v. 31, p. 228–251, 1954.

VINATEA, L. A. Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura. Editora da UFSC. 166pp, 1997.

WATERMAN, T.H. Physiology of Crustacea. Academic Press, New York, 1960.

WILKES, P.R.H., MCMAHON, B.R. Effect of maintained hypoxic exposure on the crayfish *Orconectes rusticus*. II. Modulation of haemocyanin oxygen affinity. J. Exp. Biol. v. 98, p. 139–149, 1982.

WOLVERKAMP, H.P., WATERMAN, T.H., Respiration. In: Waterman, T.H. (Ed.), Physiology of Crustacea. Academic Press, New York, v. 1, p. 35–100, 1960.

ZHANG, P.D., ZHANG, X.M.; LI, J. E HUANG, G.Q. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding conditio non lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Aquaculture, v. 256, p. 579-587, 2006.

ANEXO

Sistema de ar (pedra porosa de madeira, soprador de ar e cilindro gás nitrogênio) e unidades experimentais.

