



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOQUÍMICA

Cristina Rios

Efeito da dieta à base de inseto (*Nauphoeta cinerea*) no crescimento, sistema imune, atividade enzimática, capacidade antioxidante e microbiota em *Litopenaeus vannamei*

Florianópolis
2022

Cristina Rios

Efeito da dieta à base de inseto (*Nauphoeta cinerea*) no crescimento, sistema imune, atividade enzimática, capacidade antioxidante e microbiota em *Litopenaeus vannamei*

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica.
Orientador: Prof., Dr. Carlos Peres Silva.

Florianópolis

2022

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

Rios, Cristina

Efeito da dieta à base de inseto (*Nauphoeta cinerea*) no crescimento, sistema imune, atividade enzimática, capacidade antioxidante e microbiota em *Litopenaeus vannamei* / Cristina Rios ; orientador, Carlos Peres Silva, 2022.

68 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em , Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. . 2. Entomofagia . 3. Ração. 4. Camarão . 5. Enzimas digestivas. . I. Peres Silva, Carlos . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em . III. Título.

Cristina Rios

Efeito da dieta à base de inseto (*Nauphoeta cinerea*) no crescimento, sistema imune, atividade enzimática, capacidade antioxidante e microbiota em *Litopenaeus vannamei*

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof., Dr. Richard I. Samuels.

Instituição Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Prof., Dr. Boris Carlos Ugarte Stambuk

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a), Dr.(a) Debora Fracalossi

Instituição Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

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

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof., Dr. Carlos Peres Silva

Orientador

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao meu orientador Carlos Peres Silva pela oportunidade, e que me recebeu de braços abertos no laboratório;

Aos meus pais Daniel Antônio Rios e Elizabete Maria Garcia,

À minha querida irmã Sabrina Rios que sempre me apoiou,

Aos amigos de laboratório Theo Bräscher, Roseane Panini, Julia Ferreira, Ana Carolina Gonçalves e Gabriel Braga;

À querida técnica Gabriela Karasiak;

Aos amigos do laboratório e ao professor Boris Stambuk: Eduardo Zanella, Angela Santos, Leonardo Kretzer, João Viana e Tainá Bueno pela companhia maravilhosa e amizade;

Aos colegas do laboratório e ao professor Alcir Dafré: Mauricio Cuna, Barbara dos Santos, Jozimar, Monique Coelho Bion, Tanara Peres, Josiane Mann, Gudrian Almeida, Juliano Vieira, em especial Ingrid Selhorst pelas dúvidas e auxílio nos experimentos;

Aos colegas do laboratórios LCM em especial ao professor Felipe Vieira, e as queridas Jaqueline Coelho, Norha Bolivar, Ariane Martins, Karolina Vitória Rosa, Priscila Rezende pela ajuda nos experimentos de manejo, e a equipe técnica do laboratório LCM, aos queridos David Ramos Grapp, Ilson Ramos Grapp, Dimas Ramos, Diego Telles, Carlos Miranda, Claudia Machado por toda ajuda e Andrea Jesus pelo cafezinho maravilhoso;

Ao Labnutri, em especial a querida professora Debora Fracalossi, Maria Fernanda Oliveira, Fernando Brignol pela ajuda com a elaboração da ração e composição centesimal;

Leidiane Accordi por toda paciência e ajuda com os dados;

Ao LAMEB e sua equipe sempre disposta a ajudar;

Aos queridos seguranças do campus;

Às agências de fomento (CAPES e CNPq e INCT- Entomologia Molecular);

A esta universidade maravilhosa, pública, gratuita e de qualidade, da qual tive o imenso prazer de estudar todos esses quatorze anos.

RESUMO

O cultivo de camarões marinhos é uma atividade muito lucrativa e uma das espécies mais produzidas devido a fatores zootécnicos favoráveis é o camarão-branco-do-pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). Um dos grandes entraves da sua produção, além da fácil disseminação de agentes patogênicos, é o alto custo dos insumos com a alimentação. Em geral, na nutrição de espécies aquícolas, é utilizada a farinha de peixe como ingrediente proteico principal. No entanto, buscam-se fontes alternativas de proteína sustentáveis e econômicas. Com isso, tem sido elaborados estudos com o uso de farinha de insetos na alimentação de camarões. Este trabalho tem por objetivo analisar o perfil de enzimas digestivas, análise da microbiota intestinal, parâmetros imunológicos e estresse oxidativo de camarões juvenis da espécie *L. vannamei* (n=9), com peso inicial de $6,10 \pm 0,52$ g (média, \pm desvio padrão), peso final de $9,05 \pm 0,49$ g e com um ganho de peso de $2,60 \pm 0,74$ g, em experimento realizado durante vinte dias. Os camarões foram alimentados com farinhas de *Nauphoeta cinerea* (NC), em diferentes níveis de substituição, com 25%, 50%, 75% e 100% e o controle (farinha de peixe). O experimento foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC (LCM) iniciando com o cultivo dos camarões juvenis em aquários, com fornecimento diário das rações. Após esse período, os animais foram eutanasiados, sendo dissecados o hepatopâncreas e esses mantidos em nitrogênio líquido e freezer -80 °C. Os hepatopâncreas foram homogeneizados e centrifugados para a realização dos ensaios enzimáticos para determinação de atividades proteolíticas do tipo tripsina, do tipo quimotripsina, lipases e α -amilases. Zimogramas utilizando-se géis SDS-PAGE foram obtidos para fracionamento das atividades proteolíticas e amilásicas. Também foram analisadas as enzimas catalase, contagem de hemócitos e atividade aglutinante na hemolinfa. Os dados obtidos mostram que o ganho de peso, taxa de crescimento específico e taxa de sobrevivência não foram afetados com a substituição de farinha de peixe por farinha de inseto na dieta dos camarões. Os resultados de atividade absoluta e específica de tripsina, quimotripsina, lipase e α -amilase demonstram não haver diferenças significativas entre o controle e os tratamentos, assim como nos padrões das atividades enzimáticas encontradas nos zimogramas. Com relação aos parâmetros imunológicos da hemolinfa a concentração proteica, a contagem de hemócitos, a atividade de fenoloxidase e hemaglutinante, demonstram não haver diferenças significativas entre o controle e os tratamentos. O mesmo foi observado com relação às dosagens de catalase. Com relação à microbiota intestinal, nossos resultados mostraram que os filos dominantes em ordem

crescente foram: Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia e Planctomycetes, nesta ordem. No entanto, embora não tenham sido encontradas diferenças na diversidade bacteriana, o nível de substituição NC-100 quando comparado com o controle, apresenta uma maior diversidade de gêneros. Contudo, foi possível observar um padrão semelhante de microbiota entre os outros tratamentos.

Palavras-chave: Entomofagia; Ração; Camarão; Enzimas digestivas; Sistema imunológico; Microbiota.

ABSTRACT

The cultivation of marine shrimp is a very lucrative activity and one of the most produced species due to favorable zootechnical factors is the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). One of the major barriers to its production, in addition to the easy dissemination of pathogenic agents, is the high cost of inputs with feed. Overall, in the nutrition of aquaculture species, fishmeal is used as the main protein ingredient. However, sustainable and economical alternative sources of protein are sought. Therefore, studies have been carried out with the use of insect flour in shrimp feed. This work aims to analyze the profile of digestive enzymes, analysis of the intestinal microbiota, immunological parameters and oxidative stress of *Litopennaeus vannamei* juveniles (n=9), with an initial weight of 6.10 ± 0.52 g (mean, \pm standard deviation), final weight of 9.05 ± 0.49 g and with a weight gain of 2.60 ± 0.74 g, in an experiment held out for twenty days. Shrimps were fed with *Nauphoeta cinerea* (NC) flour, at different levels of substitution, with 25%, 50%, 75% and 100% and the control (fishmeal). The experiment was carried out at the Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC (LCM) starting with the cultivation of shrimp juveniles in aquariums, with a daily supply of feed. After this period, the animals were euthanized, the hepatopancreas being dissected and kept in liquid nitrogen and freezer -80 °C. The hepatopancreas were homogenized and centrifuged for enzymatic assays to determine trypsin-like, chymotrypsin-like, lipase and α -amylase activities. Zymograms using SDS-PAGE gels were obtained to fractionate α -amylases. The following parameters were also analysed in hemolymph: catalase activity, total hemocyte count and hemagglutinating activity. The data showed that the weight gain, specific growth rate and survival rate were not affected with the replacement of fishmeal by insect meal in the shrimp diet. The results of absolute and specific activity of trypsin, chymotrypsin, lipase and α -amylase demonstrated that there were no differences between the control and treatments, as well as the patterns of enzymatic activities found in the zymograms. In relation to immunological parameters of hemolymph, such as protein concentration, hemocyte count, phenoloxidase and hemagglutinating activity, there were no significant differences between control and treatments. The same was observed in relation to catalase activity. Regarding the intestinal microbiota, our results showed that the dominant phyla in ascending order were: Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia and Planctomycetes. However, although no differences were found in bacterial diversity, the NC-100 substitution level presents a greater

diversity of genus. However, it was possible to observe a similar microbiota pattern among the other treatments.

Keywords: Entomophagy; Feed; Shrimp; Digestive enzymes; Imunne system; Microbiota.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Média do ganho peso (a), TCE (b) e taxa de sobrevivência (c) do camarão <i>L. vannamei</i>	36
Figura 2-Média da atividade da enzima tripsina (a) e quimotripsina (b) no hepatopâncreas de camarão <i>L. vannamei</i> alimentado com farinha de <i>N. cinerea</i>	37
Figura 3-Média da atividade da enzima lipase no hepatopâncreas de <i>L. vannamei</i> alimentado com farinha de <i>N. cinerea</i>	38
Figura 4-Média da atividade da enzima α -amilase no hepatopâncreas de camarão <i>L. vannamei</i> alimentado com farinha de <i>N. cinerea</i>	38
Figura 5- Zimograma de atividade de α -amilase.....	39
Figura 6- SDS-PAGE de proteínas.....	40
Figura 7- Média da contagem de hemócitos (a), título de aglutinação das lectinas (b), atividade da enzima fenoxidase (c) e quantidade de proteína (d) na hemolinfa de camarão <i>L. vannamei</i> alimentado com farinha de <i>N. cinérea</i>	41
Figura 8- Média da atividade da enzima CAT.....	42
Figura 9- Microbiota.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição dos ingredientes proteicos	27
Tabela 2- Composição centesimal	28
Tabela 3- Composição de aminoácidos	28
Tabela 4- Microbiota	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACN – acetonitrila.
- BCA – ácido biciconínico.
- bz-R-pNA – N-benzoil-dl-argininil-p nitroanilida.
- DMSO – dimetilsulfóxido.
- FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Do inglês Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- NRC – National Research Council.
- OD – Oxigênio Dissolvido.
- PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida.
- PUFAs – Ácidos graxos poli-insaturados. Do inglês Polyunsaturated Fatty Acids.
- SDS – Dodecil sulfato de sódio.
- suc-AAPF-pNA – succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanil-p nitroanilida.
- Tris – tris(hidroximetil)aminometano.
- V – Volts.
- WSSV – Vírus da síndrome da mancha branca. Do inglês White spot syndrome vírus.
- RNA – Ácido ribonucleico. Do inglês ribonucleic acid.
- CAT – Catalase.
- SOD – Superóxido dismutase.
- PO – Fenoloxidase. Do inglês phenol oxidase.
- TBS – Solução Salina Tris. Do inglês Tris-Buffered Saline
- L-DOPA – L-dihidroxifenilalanina
- LPS – Lipopolissacarídeos
- ROS – Espécies Reativas de Oxigênio.
Do inglês reactive oxygen species.
- RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio.
Do inglês reactive nitrogen species.
- EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
- KPi – Tampão fosfato de potássio
- TEA – tietanolamina
- DEA – dietanolamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 A importância da carcinicultura	15
1.2 O camarão marinho <i>L. vannamei</i>	15
1.3 Nutrição na aquicultura	16
1.4 O uso de insetos comestíveis como fonte de nutrientes	17
1.5 Importância da entomofagia na segurança alimentar	18
1.6 Fisiologia digestiva em peneídeos.....	20
1.7 Aspectos do sistema imune em peneídeos.....	21
1.8 Mecanismos de defesa antioxidante em peneídeos	22
1.9 Aspectos da microbiota intestinal em peneídeos.....	24
2. Objetivos.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. Material e Métodos	26
3.1 Animais e condições gerais de manutenção	26
3.2 Delineamento Experimental	26
3.3 Avaliação do desempenho zootécnico.....	29
3.4 Determinação de atividades enzimáticas.....	29
3.4.1 Determinação de atividade proteolítica	29
3.4.2 Determinação de atividade lipásica	30
3.4.3 Determinação de atividade amilásica	30
3.4.4 Determinação de proteína.....	31
3.4.5 Determinação de atividades enzimáticas em géis de eletroforese semi-desnaturantes ...	31
3.4.6 Zimogramas em géis de poliacrilamida SDS-PAGE.....	31
3.4.7 Determinação de atividade amilásica in gel	31
3.5 Determinação dos parâmetros imunológicos	32
3.6 Determinação da atividade das enzimas catalase (CAT)	33
3.7 Caracterização da microbiota por sequenciamento	33
3.7.1 Extração de DNA.....	33
3.7.2 Sequenciamento de PCR e 16S	33

3.7.3 Análise de bioinformática.....	34
3.8 Análise estatística	35
4. Resultados.....	35
4.1 Avaliação do desempenho zootécnico.....	35
4.2 Determinação de atividade proteolítica	37
4.3 Determinação de atividade lipásica	37
4.4 Determinação de atividade amilásica	38
4.5 Determinação de atividade enzimática em gel de eletroforese semi-desnaturante	39
4.6 Determinação de proteínas em gel SDS-PAGE	39
4.7 Derminação dos parâmetros imunológicos	41
4.8 Derminação da atividade da enzima catalase (CAT).....	42
4.9 Efeito da farinha de <i>N. cinerea</i> na microbiota intestinal	42
5. Discussão	46
5.1 Aspectos do desempenho zootécnico de peneídeos alimentados com <i>N. cinerea</i>	46
5.2 Aspectos da digestão em peneídeos alimentados com farinha de <i>N. cinerea</i>	47
5.3 Parâmetros imunológicos de peneídeos alimentados com farinha de <i>N cinerea</i>	49
5.4 Efeito da farinha de <i>N. cinerea</i> na microbiota intestinal	50
6. Conclusões.....	54
7. Referências Bibliográficas.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 A IMPORTÂNCIA DA CARCINICULTURA

Um dos setores mais lucrativos da aquicultura é a produção de camarões marinhos em cativeiro (carcinicultura marinha), que representa uma parcela significativa da produção do setor, pois mais da metade dos camarões comercializados são advindos de cativeiro, sendo o continente asiático um dos maiores produtores (FAO, 2017).

No Brasil, os primeiros estudos referentes à criação em cativeiro datam da década de 1970, com as espécies nativas. Esse crescimento ocorreu devido a diversos fatores e entre eles destacam-se as inovações tecnológicas nos sistemas de cultivo e práticas adequadas de manejo (Vinatea, 2004; Dotta e Piazza, 2012). O cultivo de camarões aumentou consideravelmente em meados dos anos 1990 com a introdução da espécie exótica *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2010), devido às suas características zootécnicas (Vinatea, 2004). Entretanto, no final dos anos 1990, houve um declínio na produção em virtude de epidemias principalmente de vírus e de algumas bactérias (Liu et al., 2009; Leghtner, 2011; Stentiford et al., 2012; Dugassa e Gaetan, 2018).

1.2 O camarão marinho *L. vannamei*

O camarão-branco-do-Pacífico ou camarão-da-pata-branca *Litopennaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) é originário do Leste do Oceano Pacífico, com uma ocorrência desde Sonora, no México, até Thumbes no norte do Peru (Barbieri e Neto, 2002; Dugassa e Gaetan, 2018). Os camarões marinhos se reproduzem naturalmente em alto mar, pertencem ao filo Arthropoda e ao subfilo Crustacea. Geralmente a fêmea é maior do que o macho e a desova pode variar, ou seja, o número de ovos depende do peso do animal e a fecundação é externa. Dos ovos eclodem os náuplios que se subdividem em cinco estágios (N1 a N5). Nesta fase não há alimentação exógena, pois, esses animais possuem grande reserva de vitelo. No estágio protozoa (Z1 a Z3) a alimentação é constituída de algas, já no estágio de misis (M1 a M3) há inclusão de *Artemia salina*, rotíferos e copépodes. No estágio de pós-larva, o camarão possui características de juvenis, vivendo em ambiente estuarino e retornando ao mar para maturação sexual. Em cativeiro a obtenção da maturação sexual é induzida pela ablação, ou seja, a

“remoção” do olho do animal. Novos estudos ao nível molecular estão sendo feitos para a compreensão sobre a maturação sexual e futuramente, quem sabe a extinção desta prática (Vinatea, 2004; Dugassa e Gaetan, 2018; Wang et al., 2019).

1.3 NUTRIÇÃO NA AQUICULTURA

Com relação à alimentação e à nutrição de organismos aquáticos, tem se discutido muito sobre a elaboração de rações que atendam às exigências nutricionais da espécie cultivada, e que sejam econômicas e sustentáveis. Além disso, recentemente tem ocorrido uma procura por fontes alimentares que aumentem a resistência a patógenos, seja no uso de aditivos, probióticos na ração ou até mesmo a incorporação de novas fontes proteicas alternativas, mais econômicas como farinha de ossos ou pena, farelo de soja, trigo, glúten de milho e vísceras de frango (Nunes et al., 2011). No entanto, algumas dessas fontes de origem vegetal possuem fatores antinutricionais, que não são bem metabolizados (Cuzon et al., 2004; Vieira et al., 2006; Nunes et al., 2011; Cyrino e Fracalossi, 2013).

No Brasil, em geral, as rações ofertadas para os camarões de cultivo são compostas principalmente de farinha de resíduo de peixe por ser uma fonte rica em aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e sais minerais (Suárez et al., 2009; Olsen e Hasan, 2012). Isto acarreta um aumento no preço da ração. Além disso, há uma preocupação de que a oferta da farinha de peixe (fishmeal) não atenda a demanda da aquicultura nos próximos anos (Tacon e Metian, 2008; Nunes et al., 2011; van Huis, 2012; Olsen e Hasan, 2012).

Os peneídeos são de grande importância econômica e ecológica. Estudar aspectos relacionados à sua nutrição com foco na digestão de proteínas é de suma importância, já que a fonte proteica é o insumo mais caro da produção (Suárez et al., 2009; Nunes et al., 2011).

A aquicultura utiliza boa parte da farinha de peixe produzida, visto que as rações dos organismos aquáticos como os camarões demandam alta quantidade proteica, cerca de 40% de proteína bruta. A farinha de peixe e o óleo de peixe são utilizados devido ao perfil de aminoácidos, de minerais e de ácidos graxos (Suárez et al., 2009; Olsen e Hasan, 2012). No entanto, com a estagnação dos recursos pesqueiros se prevê um aumento do preço da farinha e do óleo de peixe, além disso, dados apontam que é cada vez menor a porcentagem de uso de farinha de peixe na ração (Tacon e Metian, 2008; Nunes et al., 2011; Costa, 2019). Na busca por novas fontes proteicas para suprir a necessidade da falta de farinha de peixe, buscam-se fontes proteicas alternativas de origem animal, vegetal ou através do uso de microalgas; que

possam substituir a farinha e o óleo de peixe, de forma sustentável e econômica. Neste sentido, estudos têm sido elaborados com o uso de microalgas, ou fontes vegetais como a soja, no entanto, os vegetais apresentam poucos ácidos graxos como o EPA (eicosapentaenoico) e o DHA (docosaenoico) e aminoácidos metionina e lisina e também possuem fatores antinutricionais como fitato (Nunes et al., 2011; Barroso et al., 2014; Allen et al., 2019; Costa, 2019).

O uso de insetos como fonte proteica em substituição à farinha de peixe é bastante promissor (van Huis, 2012). Além de serem uma fonte de aminoácidos, ácidos graxos, minerais e vitaminas, ainda assim a composição dos insetos pode ser manipulada, pois sua composição varia de acordo com sua alimentação e estágio de desenvolvimento (larva, pupa, ninfa e adulto) da espécie. Alguns insetos possuem perfis de aminoácidos mais semelhantes à farinha de peixe quando comparado com a soja. Em relação à farinha de peixe, por exemplo, os insetos são deficientes em histidina, lisina e treonina, mas são melhores em metionina e tirosina que a soja (Costa, 2019; Rumpold e Schlüter, 2013b; Barroso et al., 2014; Henry et al., 2015). Além disso, a farinha de insetos pode melhorar a saúde do peixe como a resistência a patógenos (Gasco et al., 2018) e modular sua microbiota intestinal (Antonopoulou et al., 2019). A suplementação de farinhas com inseto, ao invés da substituição total das dietas, também têm apresentado resultados positivos. Antonopoulou et al., 2019, por exemplo, demonstraram que suplementação de larvas de *T. molitor* em alimentação de peixes causou alterações benéficas na microbiota das espécies de peixes sargo (*Sparus aurata*), robalo (*Dicentrarchus labrax*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

1.4 O USO DE INSETOS COMESTÍVEIS COMO FONTE DE NUTRIENTES

Os insetos têm grande importância ecológica e ocupam vários nichos ecológicos, além de representarem uma parcela significativa dos seres vivos. Atuam na reciclagem de matéria orgânica com a ingestão de detritos, além de dominar cadeias e teias alimentares. Apesar de diversos insetos estarem ligados à atuação negativa, como “pragas” na agricultura ou relacionados à transmissão de doenças, boa parte deles pode ser benéfica para a população (Gullan e Cranston, 2017).

Os insetos possuem em sua cutícula a quitina utilizada na indústria farmacêutica, alguns produzem tecido, como o bicho-da-seda (*Bombyx mori*), ainda podem ser utilizados como fonte de proteína (Finke, 2007; Katayama et al., 2008; Gasco et al., 2018), corantes como ácido carmínico, produzido pelas cochonilhas (*Dactyopius coccus*), ou podem ser utilizados para fins terapêuticos (Gullan e Cranston, 2017; van Huis, 2012; Meyer-Rochow e Chakravorty, 2013). Outros insetos são utilizados como modelo experimental, como a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (Gullan e Cranston, 2017) ou serem utilizados inclusive na agricultura espacial como fonte proteica (Katayama et al., 2008).

Em estudos recentes tem se observado o uso dos insetos como fonte de proteína alimentar humana e animal, inclusive em substituição a ingredientes que acarretam gastos para o produtor como a farinha de peixe. Um inseto utilizado para esse fim é o besouro *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), utilizado tanto em dietas para humanos como na aquicultura, por ser uma fonte rica em ácidos graxos, proteínas, minerais e vitaminas (Gullan e Cranston, 2017; Ramos-Elorduy et al., 2002; van Huis, 2012; Li et al., 2013; Siemianowska et al., 2013; Rumpold e Schlüter, 2013b; Barroso et al., 2014; Henry et al., 2015; Panini et al., 2017a). Em outros estudos observou-se o uso de diversas espécies de insetos das ordens Coleoptera, Diptera e Orthoptera, com potencial para o uso como fonte proteica de peixe cultivados (Barroso et al., 2014).

1.5 IMPORTÂNCIA DA ENTOMOFAGIA NA SEGURANÇA ALIMENTAR

A FAO (2017) prevê um aumento para 9 bilhões na população humana em 2050 e, com isso, haverá um aumento no consumo de fontes proteicas como a carne e juntamente com esse aumento uma elevação de preço, atrelado à escassez em virtude do aumento da demanda. Desta forma, há assim uma preocupação com a segurança alimentar e busca por fontes alternativas de proteína (van Huis, 2012; Meyer-Rochow e Chakravorty, 2013; Rumpold e Schlüter, 2013 a).

Os insetos podem ser utilizados como fonte de alimentação humana e animal porque possuem diversas vantagens econômicas e ambientais. Estima-se que mais de duas mil espécies de insetos são consumidas no mundo. O hábito de comer insetos por seres humanos é conhecido como entomofagia. Apesar desta prática ser muito antiga, ainda é vista como algo de países em desenvolvimento ou de povos indígenas (van Huis, 2012).

Eles são fonte de aminoácidos essenciais (lisina, metionina), minerais, lipídeos e vitaminas como tiamina, riboflavina e niacina, e recentemente tem se estudado suas

propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Finke, 2007; Katayama et al., 2008; Premalatha et al., 2011; van Huis, 2012; FAO, 2012; de Castro et al., 2018, Gasco et al., 2018). Além disso, possuem uma alta eficiência na conversão alimentar, apresentam alta fecundidade, são fáceis de cultivar, alta taxa de crescimento e possuem alta diversidade de espécies (Gullan e Cranston, 2017; Premalatha, et al., 2011; Meyer-Rochow e Chakravorty, 2013). Outra vantagem é a exigência de água por quilo de proteína e quando comparados com outros agronegócios, exige espaço reduzido do uso de terra para produção, apresenta menor risco de zoonoses, benefícios ambientais como reciclagem de matéria orgânica e pouco impacto ambiental, como emissão de gases e amônia (Gullan e Cranston, 2017; FAO, 2013; van Huis, 2012; Oonincx e Boer, 2012; FAO, 2013; Alexander et al., 2017).

Na aquicultura diversas linhas de pesquisas tem focado no uso de insetos como fonte proteica em peixes como tilápia (Sánchez-Muros et al., 2017), *catfish* (Ng et al., 2001), *Salmo salar* (Belghit et al., 2018) truta-arco-íris (Rema et al., 2019) peixe ornamental (Vargas-Abúndez et al., 2019) e camarões (Panini et al., 2017a; Motte et al., 2019; Rahimnejad et al., 2019; Rios et al., 2021). Um bom exemplo é o emprego da mosca-soldado-negro *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), indicada como fonte de proteína para peixes, aves e suínos.

A barata cinérea *Nauphoeta cinerea* pertence à ordem Blattodea da qual fazem parte os cupins com cerca de 7500 espécies (Gullan e Cranston, 2017). As cinéreas são originárias da África, embora sejam encontradas em vários países tropicais, inclusive no Brasil, estão presentes em todos os tipos de ambientes. A *N. cinerea* tem sido utilizada como modelo biológico experimental por exposição a inseticida, inclusive em trabalhos recentes como fonte proteica em pães, devido ao alto teor de proteína e composição de aminoácidos (Adedara et al., 2016; Oliveira et al., 2017; Santos et al., 2019).

1.6 FISILOGIA DIGESTIVA EM PENEÍDEOS

Os camarões podem ser classificados, quanto ao hábito alimentar, como onívoros, possuindo uma dieta diversificada baseada em detritos, poliquetos, anfípodos e algas, inclusive. Ou seja, eles podem ser considerados predadores oportunistas (Albertoni et al., 2003; Andreatta e Beltrame, 2004).

O corpo do camarão é dividido em duas partes, cefalotórax e abdômen. No cefalotórax estão localizados os pereópodos e no abdômen os pleópodos, ambos tem função de locomoção e quimiorrecepção. As antenas e antênula tem função de sensorial contra predadores e quimiorreceptores, respectivamente. O exoesqueleto atua como barreira protetora, evita a entrada de microrganismos (Jiravanichpaisal et al., 2006).

O sistema digestório é formado pelo intestino, que é dividido em três partes (anterior, médio e posterior) e esse estende-se ao longo do abdômen e tem como função a absorção, digestão e osmorregulação. Os camarões possuem a membrana peritrófica assim como os insetos, que revestem o bolo alimentar no lúmen intestinal. Nesta membrana há enzimas antioxidantes e digestivas como a tripsina; a membrana atua na imobilização e na circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas (Ceccaldi, 1989; Terra, 2001; Wang et al., 2012; Alexandre et al., 2014). O intestino anterior e posterior são cobertos por quitina formando uma barreira física e química, além de ser um ambiente ácido e com diversas enzimas que são capazes de inativar ou digerir patógenos que não fazem parte da microbiota natural do camarão (Felgenhauer, 1992; Barbieri e Neto, 2002; Jiravanichpaisal et al., 2006; Dugassa e Gaetan, 2018).

O esôfago que faz a ligação entre a boca e o estômago e auxilia na trituração dos alimentos, contém duas cavidades, a câmara cardíaca que serve para triturar os alimentos e a câmara pilórica que atua como uma peneira separando as partículas rejeitadas que podem ser regurgitadas (Ceccaldi, 1989; Felgenhauer, 1992; Barbieri e Neto, 2002; Jiravanichpaisal et al., 2006).

O hepatopâncreas é onde a maioria das enzimas digestivas é secretada, e onde ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes. Nos camarões, as enzimas mais importantes no processo de digestão de proteínas são as proteinases serínicas (quimotripsina e tripsina) sendo que suas atividades podem variar em função de alguns fatores genéticos ou alimentares (Hernández e Murueta, 2009; Dugassa e Gaetan, 2018). Além disso, o hepatopâncreas é responsável pela absorção, transporte e armazenamento de minerais, lipídios e glicogênio (Felgenhauer, 1992;

Dugassa e Gaetan, 2018). Formado por ductos e túbulos, possui uma rede de fibras que permitem movimentos peristálticos (Barracco et al., 2014).

Em peneídeos, as células fibrilares F dos túbulos do hepatopâncreas são locais de secreção das enzimas, que são sintetizadas como zimogênios e armazenadas em vacúolos supranucleares (Al-Mohanna et al., 1985; Muhlia-Almazán, et al., 2008).

De modo geral, os crustáceos possuem um sistema digestório completo formado por boca, estômago e intestino, e ainda possuem o hepatopâncreas onde ocorre a produção das enzimas que são responsáveis pela decomposição da proteína. Em crustáceos, a maior parte da obtenção de energia é de nutrientes proteicos, e o processo é feito pelas enzimas tripsina e quimotripsina, enzimas que são responsáveis por mais da metade da digestão em peneídeos (Hernández e Murueta, 2009).

Nesse sentido, a digestão de alimentos para obter nutrientes é uma função fisiológica das enzimas e, portanto, a atividade das enzimas digestivas é um excelente indicador para avaliar a capacidade de digestão. Essas enzimas já foram purificadas e caracterizadas, também os padrões de temperatura e pHs ótimos já foram mensurados em *L. vannamei* e *Penaeus californiensis* (Klein et al., 1996; Navarrete-del-Toro et al., 2015). Foi observado em *Fenneropenaeus chinensis* que a enzima tipo quimotripsina também está relacionada com a via induzida de apoptose do camarão quando infectado por WSSV (Xue et al., 2013).

1.7 ASPECTOS DO SISTEMA IMUNE EM PENEÍDEOS

Os peneídeos não possuem sistema imune adaptativo. A primeira barreira é física e composta por um exoesqueleto rígido e a segunda conta com a participação da hemolinfa, que atua no transporte de nutrientes e possui moléculas do sistema imune. Após o contato com patógenos, são ativados mecanismos de proteção para a inativação desses organismos invasores (Barracco et al., 2008; Dugassa e Gaetan, 2018).

O sistema circulatório dos crustáceos é aberto ou semi-aberto, por onde transita a hemolinfa, sendo responsável pelo transporte de nutrientes, excretas, sais, água, oxigênio e hormônios (Barracco et al, 2014; Dugassa e Gaetan, 2018). Essa atuação em múltiplas funções só é possível porque há diferentes células capazes de efetuar essas funções (Ceccaldi, 1989). Os peneídeos possuem diversos mecanismos de proteção, que incluem: a coagulação (Maningas et al., 2013) os peptídeos antimicrobianos, encapsulamento, a melanização (Soonthornchai et

al., 2010; Barracco et al., 2014; Dugassa e Gaetan, 2018) e o sistema de RNAi (Labreuche e Warr, 2013).

O processo de melanização é mediado pela fenoloxidase no sistema de cascata da profenoloxidase controlado pelas proteínas de reconhecimento padrão e possuem ainda as defesas antioxidantes, sendo que a maioria destas formas de defesas encontradas em crustáceos está também presente em insetos como na *D. melanogaster* (Barracco et al., 2008; Amparyup et al., 2013; Buchon et al., 2014). Na maioria das espécies de crustáceos a melanização envolve a síntese de melanina para processos de cicatrização e defesa como a formação de nódulos. Esses processos são mediados pela enzima fenoloxidase em uma série de reações de oxidação de fenóis em quinonas, ou seja, a conversão de tirosina em DOPA e essa em quinona por várias reações que levam à síntese de melanina, um pigmento marrom. Essa conversão acontece quando a proPO inativa é convertida em PO ativa por uma serino protease do tipo tripsina (Sritunyalucksana e Söderhäll, 2000; Marques e Barracco, 2000). O sistema proPO está presente nas células granulares dos hemócitos (Xu et al., 2014) e uma das funções mais importante nos hemócito é a proteção contra patógenos invasores, onde ele desempenha funções como participação no reconhecimento, fagocitose, melanização e citotoxicidade (Jiravanichpaisal et al., 2006). Os hemócitos tem uma participação na mobilização para lugares com presença de agentes invasores ou ferimentos, sendo assim responsáveis pela fagocitose, formação de nódulos ou cápsulas reprimindo a disseminação dos microrganismos (Barracco et al., 2008).

A ativação das enzimas do sistema proPO acontece em situação onde há reconhecimento de PAMPs (padrões de reconhecimento microbianos), ou seja, onde há presença de LPS de bactérias gram-negativas, peptidoglicano de gram-positivas e β -1,3-glucanos de fungos (Amparyup et al., 2013). Em outros estudos observou-se também que o estresse de baixa salinidade induz o sistema proPO (Zhao et al., 2015), inclusive foi visto que a maioria desses processos está presente em insetos e foi observado uma similaridade entre os genes que codificam proPO (Sritunyalucksana e Söderhäll, 2000).

1.8 MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM PENEÍDEOS

Os fagossomos se fundem com grânulos lisossomais que possuem um pH ácido e enzimas hidrolíticas, dentre elas destaca-se a lisozima, que rompe peptidoglicanos, ativando a

formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Sies, 2017; Sies et al., 2017; Barracco et al., 2008).

Os mecanismos de defesa antioxidante são conservados em praticamente todos os organismos, sendo essas defesas reguladas pela quantidade do substrato e pelo fator de transcrição de enzimas antioxidantes como o Nrf2 (Sies, 2017; Sies et al., 2017). A sinalização redox é fundamental para a homeostase celular. Esses mecanismos de controle são obtidos por meio das enzimas antioxidantes. Portanto, a produção de EROs pode ser provocada por substâncias químicas que resultam em radicais livres ou não, esses por sua vez são oxidados/reduzidos por enzimas antioxidantes como a SOD (superóxido dismutase), a CAT (catalase), tioredoxina e glutatona redutase. Em estudos com camarões observou-se a importância dessas enzimas na eliminação de EROs, obtidas também por adição de antioxidantes na dieta (Lobato et al., 2013; Sies, 2017; Sies et al., 2017; Allen et al., 2019). Recentemente, foi visto em camarão que a ativação da via NF- κ B ocorre quando há uma infecção por WSSV (Li et al., 2017).

O estresse oxidativo é um mecanismo que revela a toxicidade causada por estressante ambiental ou patógeno. Sabe-se que a geração de ROS pode levar a peroxidação lipídica, carbonilação de proteína e desequilíbrio redox (Sies, 2017; Sies et al., 2017) Sendo assim, os peneídeos também possuem um sistema antioxidante para eliminar EROs, assim como a maioria dos organismos vivos, possuindo as enzimas antioxidantes podem indicar esse estresse oxidativo, como a SOD que é uma enzima antioxidante que atua na eliminação do anión superóxido gerando peróxido de hidrogênio, já a CAT atua na decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Sies, 2017; Sies et al., 2017).

Outro mecanismo de defesa é a presença de proteínas e peptídeos antimicrobianos, que atuam rompendo as membranas fosfolipídicas de patógenos. Já as proteínas de reconhecimento padrão são capazes de detectar superfície de bactérias e fungos. As lectinas também são importantes mecanismos de defesa dos crustáceos, algumas estão presentes na própria hemolinfa atuando na regulação da microbiota, elas também são responsáveis por se ligarem a carboidratos de microrganismos invasores, que geram o processo de encapsulamento (Wang e Wang, 2013; Wang et al., 2014). Existem outros mecanismos de defesa que estão também presentes em insetos como as vias transdução de sinal *toll-like*, IMD, JAK/STAT, sistema antiviral e sistema interferol (Barracco et al., 2008; Li e Xiang, 2013; Buchon et al., 2014).

É importante analisar parâmetros imunológicos nesses animais, sendo que os mesmos só possuem sistema imune inato para a defesa contra patógenos, já que em ambiente aquático a disseminação de bactérias acontece de forma rápida. Parâmetros como contagem de hemócitos, atividade PO, quantificação de proteína na hemolinfa, além da atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT *no* hepatopâncreas, já que é um órgão sensível ao estresse oxidativo, têm sido utilizados como uma fonte segura para indicação da saúde do animal (Sritunyaluksana e Söderhäll, 2000; Rodríguez e Moullac, 2000; Xu et al., 2018).

1.9 ASPECTOS DA MICROBIOTA INTESTINAL EM PENEÍDEOS

A microbiota presente na maioria dos organismos atua em uma relação simbiótica. Em mamíferos, microrganismos participam de processos de resposta imune como anti-inflamatórios, através da liberação de substâncias, na digestão e recentemente associada à síndrome metabólica (Jobin, 2014; Santos-Marcos et al., 2019). O perfil desses microrganismos pode variar com a idade, dieta, genética e localização (Tiihonen et al., 2010; Rajoka et al., 2017).

A microbiota presente em camarões é geralmente similar, algumas filos estão presentes majoritariamente como a *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobio*, *Bacteroidetes*. Recentemente em peneídeos observou-se que a microbiota está relacionada com estágio de desenvolvimento, influência no desempenho de crescimento e a salinidade da água. Os autores observaram que *Lactobacillus* estão presentes em intestino de camarão cultivado em baixa salinidade, enquanto os gêneros *Synechococcus* e *Vibrio* em camarão marinho. (Fan et al., 2019 a; Fan et al., 201b; Fan e Li, 2019). Inclusive é relatado a importância da microbiota em relação a digestão (Gao et al., 2019) em peneídeos. Em peixes foi observado a correlação entre crescimento e a microbiota, observando ainda uma possível relação com a digestão de lipídios (Forberg et al., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como Objetivo Geral a verificação da viabilidade da substituição de farinha de peixe por farinha de ninfas de *N. cinerea* em ração para o camarão *L. vannamei* através da investigação de possíveis mudanças nos parâmetros zootécnicos, imunológicos, estresse oxidativo, no perfil enzimático e na análise da microbiota intestinal de juvenis do camarão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar possíveis mudanças nos parâmetros zootécnicos de juvenis de *L. vannamei* alimentados com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de *N. cinerea*.
- Dosar a atividade específica e absoluta de enzimas digestivas (proteases, lipases e α -amilases) no hepatopâncreas de juvenis de *L. vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de *N. cinerea*.
- Analisar o efeito da substituição de farinha de peixe pela farinha de *N. cinerea* no perfil de atividade de proteases e amilases in gel através de eletroforese semi-desnaturante em gel SDS-PAGE.
- Analisar parâmetros imunológicos na hemolinfa de *L. vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de *N. cinerea*.
- Analisar parâmetros de estresse oxidativo por meio da atividade da enzima catalase no hepatopâncreas de *L. vannamei*.
- Verificar o efeito da substituição de farinha de peixe pela farinha de *N. cinerea* na microbiota intestinal de juvenis de *L. vannamei*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E CONDIÇÕES GERAIS DE MANUTENÇÃO

Os experimentos de manejo foram realizados no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM-UFSC), localizado na Barra da Lagoa - Florianópolis (SC). Juvenis do camarão *L. vannamei* (n=9), com peso inicial de $6,10 \pm 0,52$ g (média, \pm desvio padrão), peso final de $9,05 \pm 0,49$ g e com um ganho de peso de $2,60 \pm 0,74$ g, em experimento realizado durante vinte dias. Os animais foram mantidos em aquários de 60 L, em sistema fechado com renovação de aproximadamente 70% de água ao final do dia ou até que todos os resíduos de restos de alimentação ou fezes fossem eliminados, aeração constante, fotoperíodo (12h: 12h, claro/escuro), temperatura de $27,81 \pm 0,24$ °C e salinidade $33,60 \pm 0,51$.

Também foram feitas verificações de oxigênio dissolvido (OD) $5,70 \pm 0,05$ mg L⁻¹, alcalinidade $115,33 \pm 13,24$, amônia $0,61 \pm 0,25$ mg L⁻¹, nitrito $0,008 \pm 0,004$ mg L⁻¹ e pH $8,29 \pm 0,03$. Foi utilizado para medir amônia e nitrito o método calorimétrico descrito por Strickland e Parsons (1972), já o OD (oxigênio dissolvido), salinidade e temperatura foram observados com o aparelho YSI 55. O pH foi medido com potenciômetro digital da empresa Alfakit, conforme protocolos adotados pelo LCM e literatura descrita por Panini et al. (2017)a.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A alimentação foi diária, incluindo quatro refeições (quantidade equivalente a 3% da biomassa total) com as dietas para camarão com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por de farinha de barata cinérea (*N. cinerea*) desidratadas: 0%, o controle de farinha de peixe, 25%, 50%, 75% e 100% (denominadas 0-NC, 25-NC, 50-NC, 75-NC e 100-NC).

As rações foram elaboradas com auxílio do software OPTIMAL Fórmula 2000, para conter 300 g kg⁻¹ de proteína digestível e 3.000 Kcal kg⁻¹ de energia digestível, formuladas de acordo com as exigências nutricionais do camarão (Tabela 1) *L. vannamei* (NRC, 2011).

A ração de farinha de *N. cinerea* contém 65,12% de proteína bruta, 19,73% de lipídio, 3,83% de cinzas e 10,04 de fibras, determinados pelo laboratório CBO, Campinas (São Paulo - Brasil).

Tabela 1: Formulação e composição das dietas experimentais utilizadas para alimentar o camarão *Litopenaeus vannamei* contendo diferentes níveis de substituição da farinha de peixe pela farinha de *Nauphoeta cinerea* (NC).

Ingredientes(%)	Níveis de Substituição(%)				
	0-NC	25-NC	50-NC	75-NC	100-NC
Farinha de peixe ¹	26	19,5	13	6,5	0
Farinha de barata ²	0	5,48	10,95	16,44	21,91
Farelo de soja ³	35	35	35	35	35
Farinha de trigo ⁴	7	7	7	7	7
Milho ⁵	5	5	5	6	6
Lecitina de soja ⁶	2	2	2	2	2
Óleo de soja ⁷	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Óleo de peixe ⁸	2,5	2	1,5	1	0,5
CMC(carboximetilcelulose) ⁹	1	1	1	1	1
Celulose ¹⁰	0	1,350	3	3,6	5,2
Fosfato monocálcico ¹¹	3	3	3	3	3
Premix vit ¹²	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Premix mineral ¹³	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
Vitamina C ¹⁴	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Sulfato de magnésio ¹⁵	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Cloreto de sódio ¹⁶	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Cloreto de potássio ¹⁷	1	1	1	1	1
Colesterol ¹⁸	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Caulim ¹⁹	11,7	12	12	12	12
Composição centesimal (% matéria seca)					
Umidade	10,96	10,75	11,65	11,72	12,30
Proteína Bruta	35,79	36,06	35,76	35,90	35,12
Extrato etéreo	8,84	9,10	9,51	9,80	9,86
Cinzas	18,9	18,3	18,15	17,7	17,35

¹ Farinha de peixe - Tectron Imp. e Exp. de Prod. Veterinários LTDA (Toledo, PR, Brasil).

² *Nauphoeta cinerea*.

³ IMCOPA - Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A. (Araucária, PR, Brasil);

⁴ Nita Moinho Paulista(Santos, SP, Brasil).

⁵ Milho Agropecuária Local.

⁶ Quimidrol Com. Ind. Imp. Ltda (Joinville, SC, Brasil).

⁷ Soya Bungle Alimentos S. A(Gaspar, SC, Brasil).

⁸ Delaware Ltda (Porto Alegre, RS, Brasil).

⁹ VETEC Química Fina LTDA (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

¹⁰ Celulose Rhoister Industria e Comércio Ltda(Araçoiaba da Serra, SP, Brasil).

¹¹ VETEC Química Fina LTDA (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

¹² InVivo mix (Paulínia, SP, Brasil) – Premix vitaminico: vitamina A 3.000.000 IU; vitamina D₃ 1.000.000 IU; vitamina E 70.000 IU; vitamina K₃, 14 g; vitamina B₁ 30 g; vitamina B₂ 20 g; vitamina B₆ 33 g; vitamina B₁₂ 50.000 mcg; ácido pantotênico 40 g; biotina 750 mg; ácido nicotínico 70 g; ácido fólico 3.000 mg; excipiente

q.s.p., 1.000 g.

¹³ InVivo mix (Paulínia, SP, Brasil) – Premix mineral: potássio 6.100 mg; cobre 23.330 mg; zinco 10.000 mg; manganês 20.000 mg; selênio 125 mg; iodo 1000 mg; cobalto 50 mg; excipiente q.s.p. 1.000 g.

^{15,16,17} VETEC Química Fina LTDA (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

¹⁸ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

¹⁹ DSM Produtos Nutricionais (São Paulo, SP, Brasil).

Tabela 2: Composição centesimal (base seca) do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição da farinha de peixe pela farinha de *Nauphoeta cinerea* (NC).

Níveis de substituição	Umidade(%)	Proteína bruta(%)	Extrato etéreo(%)	Cinzas(%)
0-NC	23,34 ^a	71,47 ^a	9,01 ^a	13,79 ^a
25-NC	24,36 ^a	72,11 ^b	7,15 ^a	13,88 ^a
50-NC	23,88 ^a	75,48 ^b	7,29 ^a	12,5 ^a
75-NC	24,34 ^a	76,06 ^b	8,48 ^a	12,9 ^a
100-NC	25,54 ^b	77,81 ^b	9,43 ^a	12,10 ^b

*Letras diferentes indicam diferenças significativas.

Tabela 3. Composição de aminoácidos da farinha de barata cinérea (*Nauphoeta cinérea*)

Aminoácidos	Resultado % (Método MA)
Ácido aspártico	5,71
Ácido glutâmico	6,31
Serina	2,33
Glicina	4,07
Histidina	1,92
Taurina	Não detectado
Arginina	3,08
Treonina	2,00
Alanina	4,56
Prolina	3,03
Tirosina	3,18
Valina	3,66
Metionina	0,91
Cistina	0,84
Isoleucina	2,13
Leucina	3,85
Fenilalanina	2,27
Lisina	3,31
Triptofano	0,45
Soma dos aminoácidos	53,61
Umidade e voláteis	7,97

3.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

Ao final do manejo alimentar (20 dias) foi realizada uma biometria final de todos os camarões de cada tratamento. Para isto, os camarões foram pesados em balança analítica. Os dados coletados nas biometrias foram utilizados para determinação das seguintes variáveis de desempenho zootécnico:

- Ganho em Peso Total (g): ganho em peso final – peso inicial.
- Taxa de Sobrevivência (%) = (número final de camarões / número inicial de camarões) × 100.
- Taxa de Crescimento Específico (%) = $\frac{\text{Log peso corporal final} - \text{Log peso corporal inicial}}{\text{número de dias}} \times 100$.

3.4 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Após o manejo alimentar, os camarões foram colocados em gelo e foi realizada dissecação para a coleta dos hepatopâncreas, que foram mantidos em tubos cônicos tipo Eppendorfs. Posteriormente, os hepatopâncreas foram homogeneizados em 1mL de água destilada com auxílio de pistilos e tubos cônicos, contendo apenas um hepatopâncreas por tubo e centrifugados a 15.000 x g, durante trinta minutos a 4°C, sendo coletado o sobrenadante.

3.4.1 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A atividade tipo tripsina foi medida utilizando como substrato o composto N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (bz-R-pNA), conforme protocolo adaptado originalmente de Erlanger et al. (1961) e Delmar et al. (1979). Esse substrato sintético foi inicialmente dissolvido em dimetilsulfóxido e tampão fosfato de sódio dibásico 50mM, pH 7,5 para uma concentração de 4mM. As análises foram feitas incubando-se 50µL de amostra com 50µL da solução substrato/tampão em banho-maria (concentração do substrato no meio de reação de 2mM) por pelo menos quatro diferentes períodos de tempo à temperatura de 30°C. As reações foram paradas com 100µL ácido acético 30% (v/v), e posteriormente foram feitas as leituras de

absorbâncias a 410nm em leitor de microplacas TECAN (Infinite pro, Califórnia, EUA). Uma curva padrão com p-nitroanilina foi usada como referência para os cálculos de atividade.

A atividade da quimotripsina foi medida com 4mM de succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanil-p nitroanilida (suc-AAPF-pNA), substrato sintético que foi dissolvido em dimetilsulfóxido e tampão fosfato de sódio dibásico 50mM, pH 7,5. As análises foram feitas com 50 μ L de amostra e 50 μ L de substrato tampão em banho-maria (concentração do substrato no meio de reação de 2mM) por pelo menos quatro diferentes períodos de tempo à temperatura de 30°C. As reações foram paradas com 100 μ L ácido acético 30% (v/v), e posteriormente foram feitas as leituras de absorbâncias a 410nm em leitor de microplacas TECAN (Infinite pro, Califórnia, EUA). Uma curva padrão com p-nitroanilina foi usada como referência para os cálculos de atividade. Uma unidade de atividade enzimática proteolítica contra substrato derivados de p-nitroanilina foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar o equivalente a 1 μ mol de p-nitroanilina por minuto.

3.4.2 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE LIPÁSICA

A atividade da lipase foi medida com metil umbeliferol oleato, substrato sintético que foi dissolvido em acetonitrila (ACN) para uma concentração de 1 μ M. As análises foram feitas com 50 μ L de amostra e 50 μ L de substrato-tampão (Tris-HCl 100mM, pH 7,5) com leitura de fluorescência a excitação de 355nm e emissão de 460nm em fluorímetro de placas. Uma curva padrão com metil umbeliferona foi usada como referência para os cálculos de atividade. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de metil umbeliferona por minuto.

3.4.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE AMILÁSICA

Para o ensaio de α -amilase utilizou-se protocolo originalmente adaptado de Noelting (1948). Primeiramente foi feito um tampão acetato de sódio 50mM, NaCl 20mM, CaCl₂ 2mM, pH 5,5 e amido 1% (m/v). Em seguida foram incubados 25 μ L das amostras e 25 μ L do substrato amido 1% (m/v) em tampão acetato de sódio descrito acima, que foram colocados em banho-maria a 30°C. Essas reações foram paradas com adição de 100 μ L de DNS (ácido dinitrossalicílico) em pelo menos quatro intervalo de tempo. Após as amostras foram aquecidas a 100 °C durante cinco minutos e adicionados 100 μ L de água destilada ao final. Posteriormente,

foram feitas as leituras de absorvância a 550nm em leitor de microplacas TECAN (Infinite pro, Califórnia, EUA). Uma curva padrão com glicose foi usada como referência para os cálculos de atividade. Logo, considera-se que uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de equivalente de glicose por minuto.

3.4.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

Para a determinação de proteínas, o método baseado na adsorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, proposto por Bradford (1976), foi empregado utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

3.4.5 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS EM GÉIS DE ELETROFORESE SEMI-DESNATURANTES

3.4.6 ZIMOGRAMAS EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE

Para a obtenção dos zimogramas foram utilizados géis de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (m/v) contendo gelatina 0,1% (m/v). As amostras foram homogeneizadas em água destilada com pistilo e colocadas em centrifugas 15000 x g, durante trinta minutos a 4°C e retirado o sobrenadante. Após esses procedimentos as amostras foram mantidas em gelo e misturadas com tampão de amostra. O tampão de amostra continha Tris-HCl 200mM, pH 6,8, glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,1 % (m/v) e SDS 2,5% (m/v). O equipamento utilizado para a corrida eletroforética foi o mini-Protean III BioRad (EUA). A eletroforese foi realizada em geladeira com voltagem constante de 150V com temperatura de 4°C, até a frente de corrida marcada pelo azul de bromofenol atingir o fundo do gel (Laemli, U.K., 1970).

3.4.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE AMILÁSICA IN GEL

Para a obtenção dos zimogramas foram utilizados géis de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (m/v). As amostras foram homogeneizadas em água destilada com pistilo e colocadas em centrifugas 15000 x g, durante trinta minutos a 4°C e retirado o sobrenadante. Após esses procedimentos as amostras foram mantidas em gelo e misturadas com tampão da amostra, esse

tampão que contem Tris-HCl 200mM pH 6,8, glicerol 20% (v/v), bromofenol blue 0,1 % (m/v), SDS 2,5% (m/v) e água destilada. O equipamento utilizado foi mini-Proteína III BioRad (EUA). A eletroforese foi realizada em geladeira com voltagem constante de 150 V com temperatura de 4°C, até o azul de bromofenol atingir o fundo do gel, o gel foi renaturado com incubação de triton X-100 2,5% (v/v). Após esse período, o gel foi incubado em tampão acetato de sódio 100mM pH 5,5 e amido 1% (m/v) durante uma hora a 30°C e corado com lugol 10% (v/v) (Laemli, U.K., 1970).

3.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

Ao final do experimento foi realizada a coleta da hemolinfa do sinus ventral e realizado um pool de cinco camarões de cada tratamento (cerca de 300µL por animal) em seringas resfriadas estéreis de 1mL mantidas a 4 °C. Da hemolinfa coletada, 10µL foram fixados em solução anticoagulante Alsever modificado - MAS (citrato de sódio 27mM, EDTA 9mM, glicose 115mM, NaCl 336mM, pH 7,2) com 4% de formaldeído para contagem total de hemócitos (THC). O restante foi coagulado a 4°C e centrifugado a 12.000 xg por dez minutos para obtenção do soro que foi aliquoteado e estocado a -20°C. O número de hemócitos por mililitro de hemolinfa foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer.

A capacidade aglutinante da hemolinfa foi feita a partir do soro que foi mantido em tubo tipo Eppendorf, após a coleta e deixado coagular. Depois centrifugado a 12.000 x g por dez minutos. Os ensaios foram feitos em microplacas tipo U, sendo adicionados 50µL de TBS (50mM de Tris, 5mM de MgCl₂, 10mM de CaCl₂, 150mM de NaCl, pH 7,4) e 50µL de amostra do soro em diluições seriadas, após adicionado à solução de eritrócitos de NaCl 0,15M a 2% e deixado incubar por duas horas em câmara úmida. No controle, o soro dos camarões foi substituído por TBS. O título aglutinante foi expresso como o recíproco da maior diluição ainda com presença de aglutinação (Söderhäll; Hall, 1984)

A atividade da fenoloxidase (PO) do soro foi determinada por espectrofotometria, pela formação do pigmento DOPA-cromo, após a oxidação do substrato l-dihidroxifenilalanina (l-DOPA). A atividade foi feita em microplaca de 96 poços de fundo chato, contendo 50 µL das amostras já diluídas (1:9), 100 µL de TBS (Tris 1mM, NaCl 336mM, CaCl₂ 5mM, MgCl₂ 10mM, pH 7,6) no controle, 50 µL de TBS na basal, na induzida apenas 50 µL de tripsina (Sigma, 1 mg/mL) e amostras e 50 µL de L-DOPA na induzida e na basal. A formação do DOPA-cromo foi monitorada, após incubação de 5, 10, 15 e 20 minutos a 25 °C, e leitura em

leitor de microplacas em um comprimento de onda de 490nm. A atividade da PO foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na abs/min/mg de proteína (Söderhäll; Hall, 1984).

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS CATALASE (CAT)

Após o manejo alimentar (20 dias) dos camarões foi realizada dissecação para a coleta dos hepatopâncreas, que foram mantidos em tubos cônicos tipo Eppendorfs. Posteriormente, os hepatopâncreas foram colocados imediatamente em nitrogênio líquido e posterior freezer -80°C. Os hepatopâncreas foram homogeneizados com solução HEPES 20mM, EDTA 1 mM e triton 0,1%, centrifugados primeiramente a 2.000 x g a dez minutos somente com solução HEPES e depois a 20.000 x g por quinze minutos a 4 °C (Xu et al., 2018).

3.7 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA POR SEQUENCIAMENTO

Para análise da microbiota intestinal dos camarões foi realizada dissecação para a coleta do conteúdo intestinal em fluxo laminar, com material estéril. O conteúdo intestinal foi mantido em tubos cônicos tipo Eppendorfs estéril. Posteriormente em freezer -80°C, até o envio para a empresa Neopropecta (Florianópolis-SantaCatarina/Brasil) para análise de sequenciamento de DNA, realizada para caracterizar as bactérias presentes no conteúdo intestinal dos camarões (12 camarões por pool) além disso, por meio de programas computacionais que consistem em análises de bioinformática e a implementação dos dados em plataforma de visualização.

3.7.1 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA das amostras foi realizada com o Mini Kit PureLink™ Genomic DNA (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. O DNA total extraído foi utilizado como molde para o Sequenciamento de Próxima Geração (NGS) 16S, realizado na plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, Califórnia).

3.7.2 SEQUENCIAMENTO DE PCR E 16S

O microbioma das amostras foi acessado usando sequenciamento de alto rendimento para identificação taxonômica bacteriana baseada em regiões conservadas e variáveis V3/V4 do gene 16S rRNA-iniciadores 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (Caporaso et al., 2012; Wang e Qian, 2009). Logo após a extração do DNA, as PCRs foram realizadas utilizando um protocolo descrito por Christoff et al. (2017) desenvolvido pela *Neoprosecta*. Uma primeira PCR é realizada contendo sequências baseadas em adaptadores TruSeq da Illumina, o que permite uma segunda PCR usando *primers* com sequências indexadas. A PCR foi realizada em três repetições utilizando Taq Platinum (Invitrogen, EUA) nas seguintes condições: PCR1) 95 ° C - 5 min, 25 ciclos (95 ° C -45 s, 55 ° C-30 s, 72 ° C - 45 s) e extensão final 72 ° C - 2 min; PCR2) 95 ° C - 5 min, 10 ciclos (95 ° C - 45 s, 66 ° C - 30 s, 72 ° C - 45 s) e extensão final 72 ° C - 2 min. Os produtos finais da reação foram purificados usando AMPureXP (Beckman Coulter, Brea, CA) e as amostras foram agrupadas em bibliotecas. As bibliotecas foram quantificadas por PCR em tempo real usando KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems, Woburn, MA). O sequenciamento dos *pools* das bibliotecas foi realizado no sistema sequenciador MiSeq (Illumina Inc., EUA) utilizando kits de ciclos V2 -500, em *single-end*, sem normalização das bibliotecas. Os dados brutos (sequências de DNA em arquivos fastq) foram analisados através do workflow de bioinformática considerando no máximo 1% de erro acumulado no sequenciamento. Para identificar as espécies de microrganismos presentes nas amostras, as sequências de DNA obtidas foram comparadas com um banco de dados próprio da empresa.

3.7.3 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Os dados de sequenciamento para cada amostra foram processados no pacote de software Quantitative Insights into Microbial Ecology (Qiime) (Caporaso et al., 2010). A saída de sequenciamento foi analisada por um filtro de qualidade de leitura, leituras com uma pontuação média de Phred <20 foram removidas, seguido por um agrupamento de leituras 100% idênticas. Grupos com menos de 5 leituras foram excluídos de análises adicionais, a fim de remover sequências quiméricas putativas. As demais sequências de boa qualidade foram agrupadas em 97% de similaridade para definir unidades taxonômicas operacionais (OTU). A classificação das OTUs foi feita comparando-as com um banco de dados rRNA 16S customizado (NEORefDB, Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil). As sequências foram taxonomicamente atribuídas com pelo menos 99% de identidade no banco de dados de

referência. Para expressar os resultados, cada OTU recebeu uma unidade arbitrária correspondente à abundância relativa calculada de acordo com a porcentagem de leituras de cada espécie em relação ao número total de sequências lidas. As espécies com um número de leituras abaixo de 1% do total de sequências lidas foram agrupadas na categoria outras.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Microsoft Excel para cálculos relacionados às curvas dos ensaios enzimáticos e dados de atividade enzimáticas foram testados por meio de análise de variância (ANOVA) e Dunnet com 5% de significância para comparação das médias. Previamente, os dados foram testados para normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os programas utilizados para a análise estatística compreensão dos dados foram o *STATISTICA* versão 13 da empresa *Statsoft* e o *GraphPad Prism 8*.

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

Os parâmetros de qualidade de água como pH, oxigênio dissolvido, amônia e nitrito, além da salinidade e temperatura, mantiveram-se dentro dos padrões aceitáveis para o cultivo de camarões (Boyd e Gautier, 2000) sem grandes variações, não sendo observada diferença significativa nestes parâmetros em relação ao controle, quando comparado com os diferentes níveis de substituição. Logo, nenhuma causa de mortalidade estava associada ao desequilíbrio dos padrões de qualidade de água exigidos para a espécie *L. vannamei*.

Nossos resultados mostraram que os teores em base seca (Tabela 2) de umidade, proteína bruta, lipídios, cinzas no corpo do camarão *L. vannamei* alimentado com *N. cinerea* foram influenciados significativamente pelas dietas testadas. Foi observado um aumento na umidade e proteína bruta, conforme os níveis de substituição foram aumentados, em compensação o teor de cinzas diminuiu, em relação ao estrato etéreo não houve alterações.

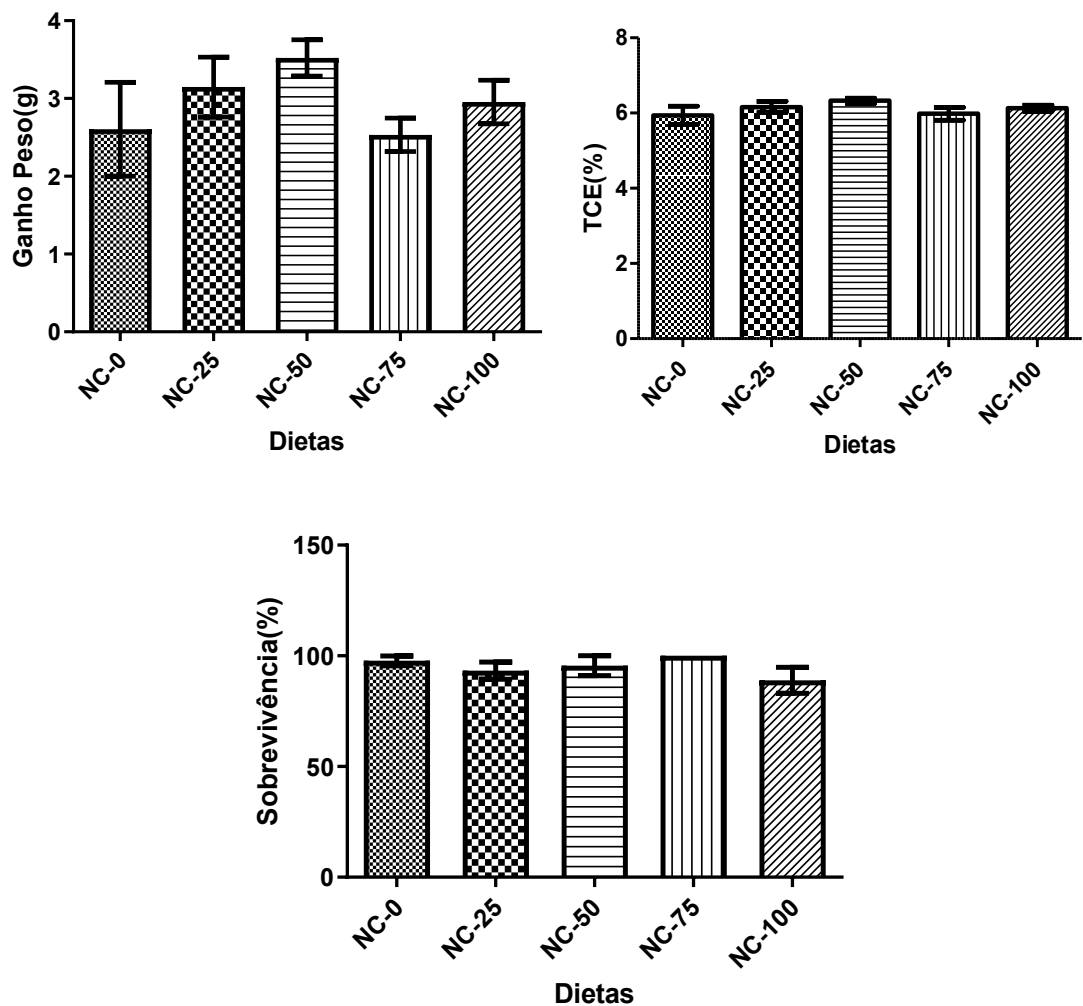


Figura 1. Média e desvio padrão do ganho de peso (g) (a), taxa de crescimento específico (%) (b) e taxa de sobrevivência (%) (c) do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de *Nauphoeta cinerea* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 20 dias. Os dados foram avaliados através de ANOVA de uma via e as médias separadas pelo teste Dunnett ambas ao nível de significância de 5%.

Com relação aos parâmetros zootécnicos: de ganho de peso (Figura 1a) e Taxa de Crescimento Específico (Figura 1b), não houve diferença significativa destes parâmetros quando comparado o controle com os diferentes níveis de substituição.

Com relação a taxa de sobrevivência (Figura 1c), não houve diferença significativa, entre os diferentes níveis de substituição, quando comparados com o controle.

4.2 Determinação de atividade proteolítica

Também foram analisadas através dos ensaios enzimáticos as atividades das enzimas tripsina, quimotripsina, lipase e α -amilase em termos absolutos e específicos, para as análises utilizou-se os substratos sintéticos. Em relação à atividade específica das enzimas tripsina (Figura 2a) e quimotripsina (Figura 2b) no hepatopâncreas de *L. vannamei* frente aos substrato sintéticos, não houve diferença significativa entre o controle (0%) e os diferentes níveis de substituição (25, 50, 75 e 100%) de farinha de *N. cinerea*.

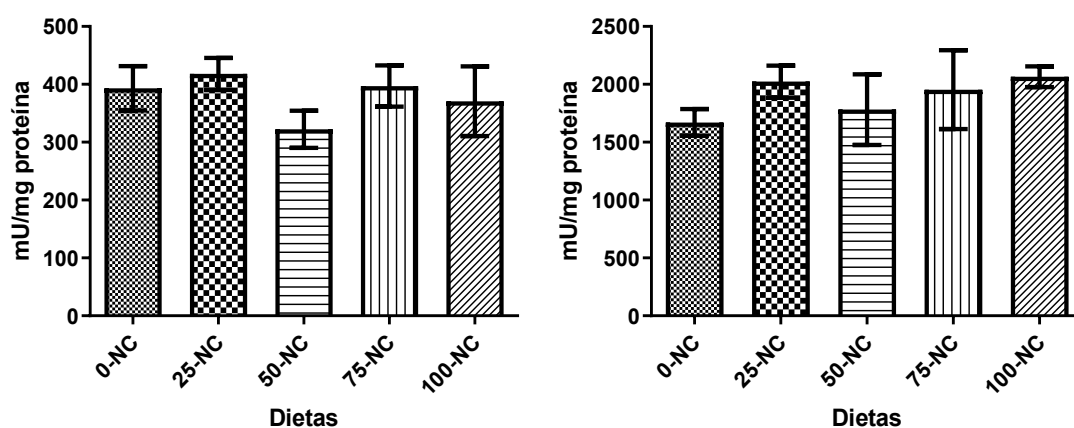


Figura 2. Média e desvio padrão da atividade específica (mU/mg de proteína) da enzima tripsina (a) e quimotripsina (b) do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de *Nauphoeta cinerea* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 20 dias. Os dados foram avaliados através de ANOVA de uma via e as médias separadas pelo teste Dunnett ambas ao nível de significância de 5%.

4.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE LIPÁSICA

Em relação à atividade específica da enzima lipase (Figura 3) no hepatopâncreas de *L. vannamei*, os resultados demonstraram que não há diferença significativa entre o controle (0%) e os diferentes níveis de substituição (25, 50, 75 e 100%) de farinha de *N. cinerea*.

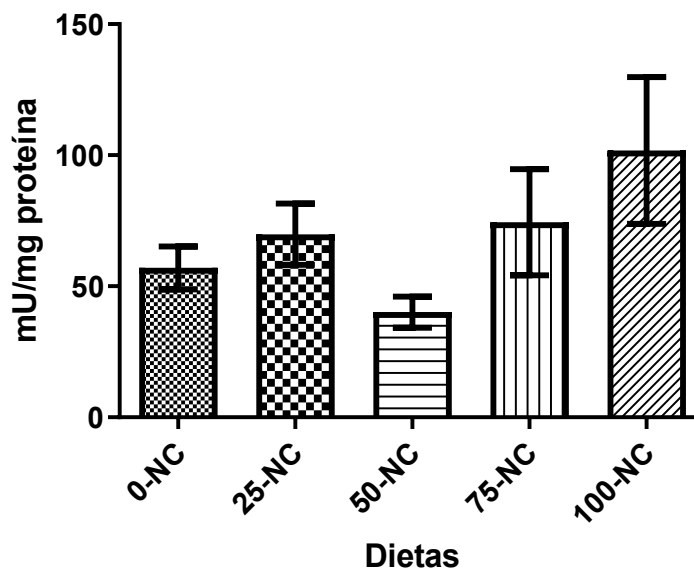


Figura 3. Média e desvio padrão da atividade específica (mU/mg de proteína) da enzima lipase do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de barata *Nauphoeta cinerea* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 20 dias. Os dados foram avaliados através de ANOVA de uma via e as médias separadas pelo teste Dunnett ambas ao nível de significância de 5%.

4.4 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE AMILÁSICA

Em relação à atividade específica da enzima α -amilases (Figura 4) no hepatopâncreas de *L. vannamei*, os resultados demonstraram que não há diferença significativa entre o controle (0%) e os diferentes níveis de substituição (25, 50, 75 e 100%) de farinha de *N. cinerea*.

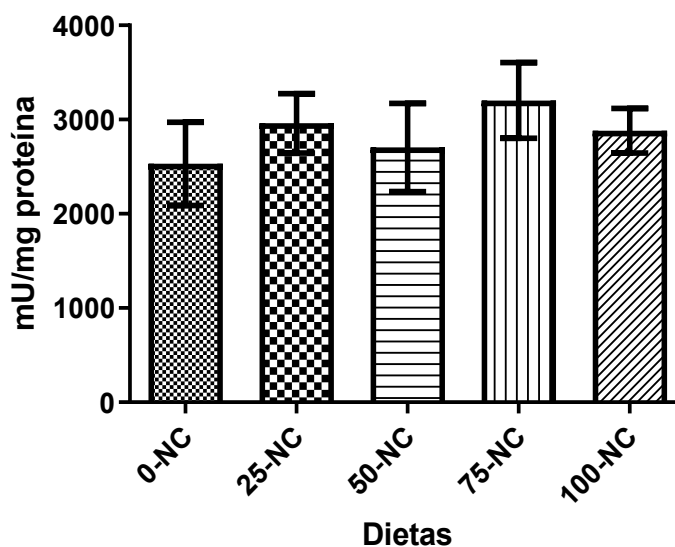


Figura 4. Média e desvio padrão da atividade específica (mU/mg de proteína) da atividade amilásica do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de barata *Nauphoeta cinerea* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 20 dias. Os dados foram avaliados através de ANOVA de uma via e as médias separadas pelo teste Dunnett ambas ao nível de significância de 5%.

4.5 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM GEL DE ELETROFORESE SEMI-DESNATURANTE

Em relação à atividade amilásica no zimograma (Figura 5), observa-se um perfil de bandas semelhantes, assim como os ensaios de atividades.

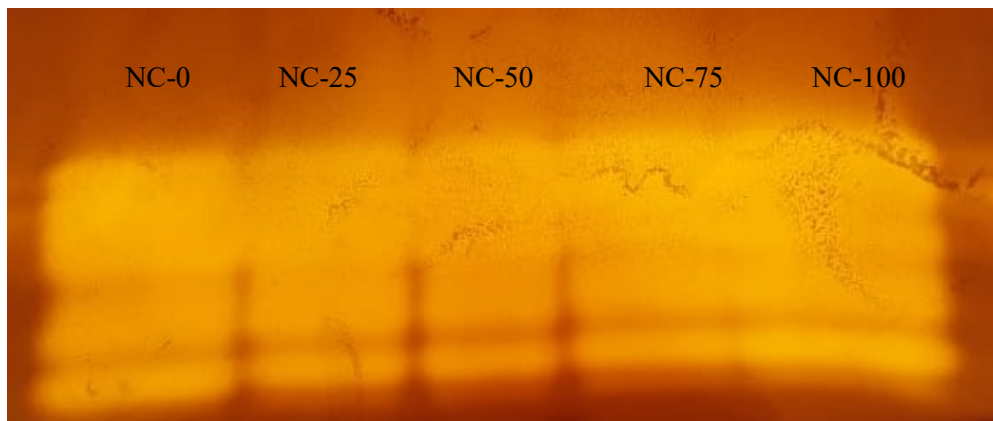


Figura 5. Zimograma de atividade de α -amilases do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de *Nauphoeta cinerea* (0, 25, 50, 75 e 100%) em gel SDS-PAGE 12% polimerizado com amido 1% e corado com lugol 10%(v/v). Normalizados por quantidade de proteína (15ug/ul).

4.6 Determinação de proteínas em gel SDS-PAGE

Em relação ao perfil das proteínas em gel de SDS-PAGE (Figura 6), observa-se um perfil de bandas semelhantes dos tratamentos em relação ao controle.

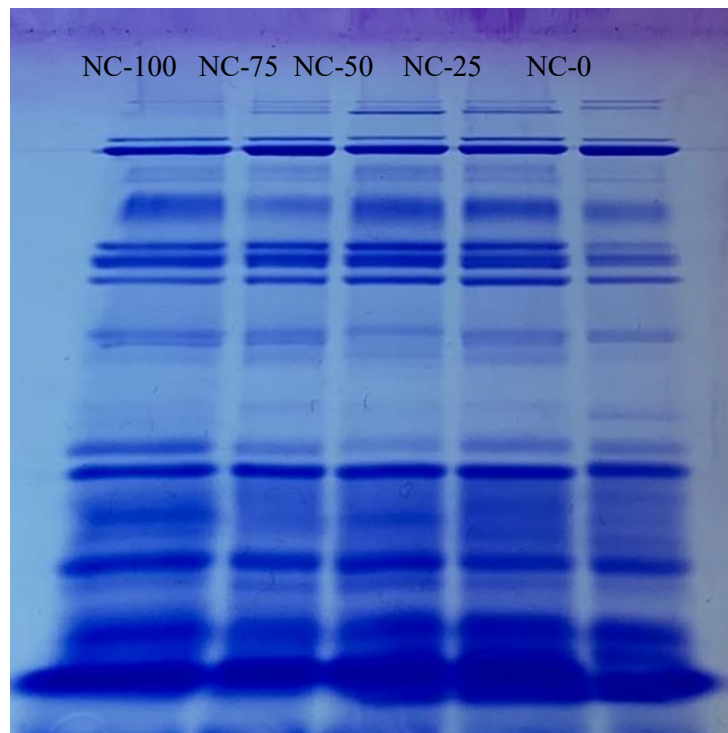


Figura 6. Gel SDS-PAGE de proteínas do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de *Nauphoeta cinerea* (100, 75, 50, 25 e 0%) em gel SDS-PAGE 12%. Normalizados por quantidade de proteína (15ug/ul).

4.7 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

Em relação à contagem de hemócitos (Figura 7a) na hemolinfa de *L. vannamei*, não houve diferença significativa entre o controle e os diferentes níveis de substituição (25, 50, 75 e 100%). Em relação à aglutinação das lectinas (Figura 7b), atividade da fenoloxidase (Figura 7c) e a quantidade de proteína (Figura 7d) na hemolinfa de *L. vannamei*, foi observado que não houve diferença significativa entre o controle, com uma dieta a base de farinha de peixe e os diferentes níveis de substituição (25, 50, 75 e 100%) com dieta a base de farinha de *N. cinerea*.

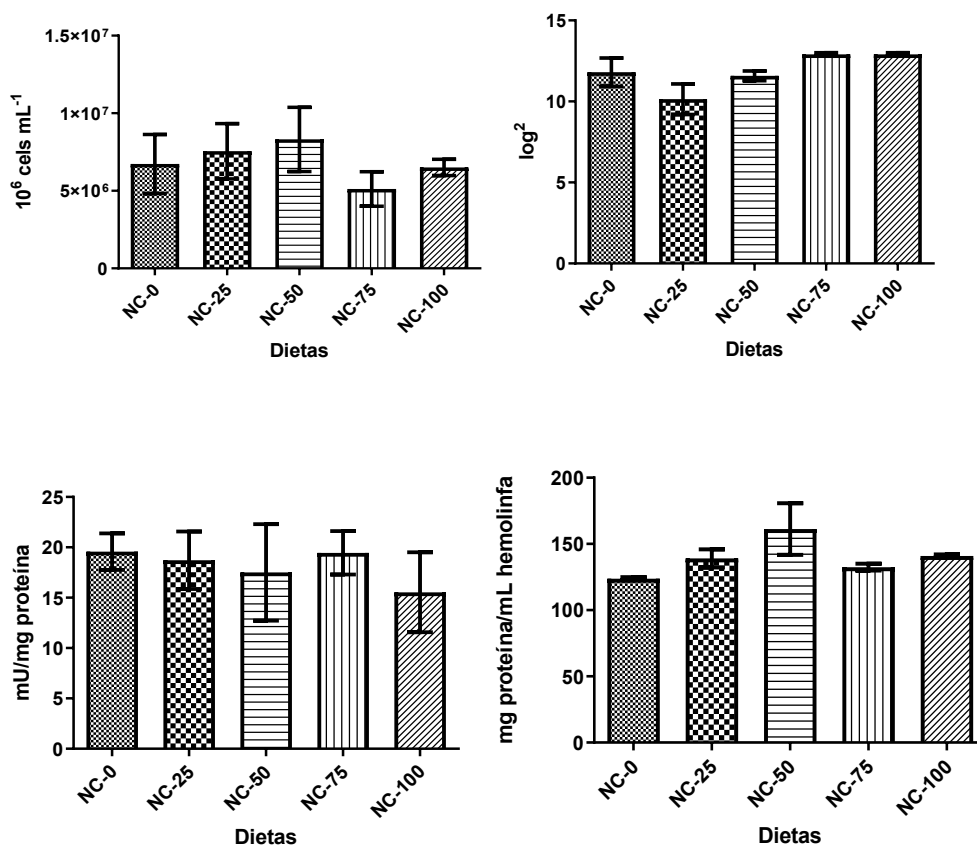


Figura 7. Média e desvio padrão de contagem de hemócitos (a), título de aglutinação das lectinas (b), atividade da fenoloxidase (c) e quantidade de proteína (mg de proteína/mL de hemolinfa) (d) em hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de *Nauphoeta cinerea* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 20 dias.

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (CAT)

Em relação a atividade da enzima catalase (Figura 8) no hepatopâncreas de *L. vannamei*, não foi observada diferença significativa entre o controle (farinha de peixe) e os diferentes níveis de substituição (25, 50, 75 e 100%) de farinha de *N. cinerea*.

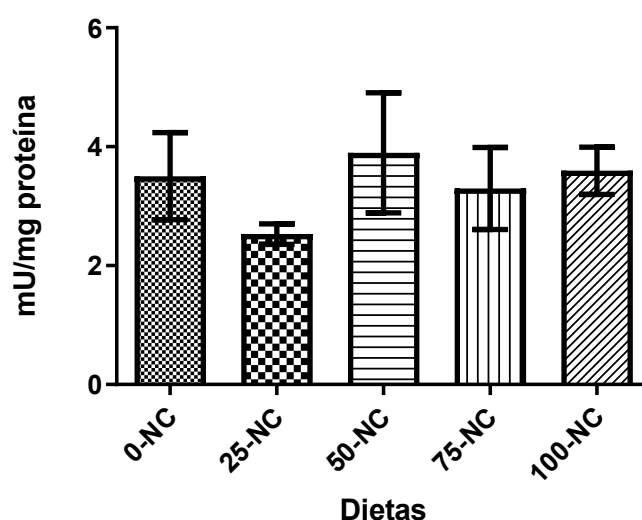


Figura 8. Média e desvio padrão de atividade da enzima catalase (mU/mg proteína) em hemolinfa de camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de *Nauphoeta cinerea* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 20 dias. Os dados foram avaliados através de ANOVA de uma via e as médias separadas pelo teste Dunnett ambas ao nível de significância de 5%.

4.9 EFEITO DA FARINHA DE *N. CINEREA* NA MICROBIOTA INTESTINAL

Em relação a microbiota o gráfico de abundância relativa (%) (Figura 9 e Tabela 4) de gêneros de bactérias no conteúdo intestinal de *L. vannamei*, nota-se um perfil semelhante de microorganismos, quando comparamos o controle com os diferentes níveis de substituição (25%, 50%, 75%) de farinha de *N. cinerea*, embora o nível de substituição 100%, apresentou uma maior variação de microorganismos. Os filos dominantes foram: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Planctomycetes*, nesta ordem.

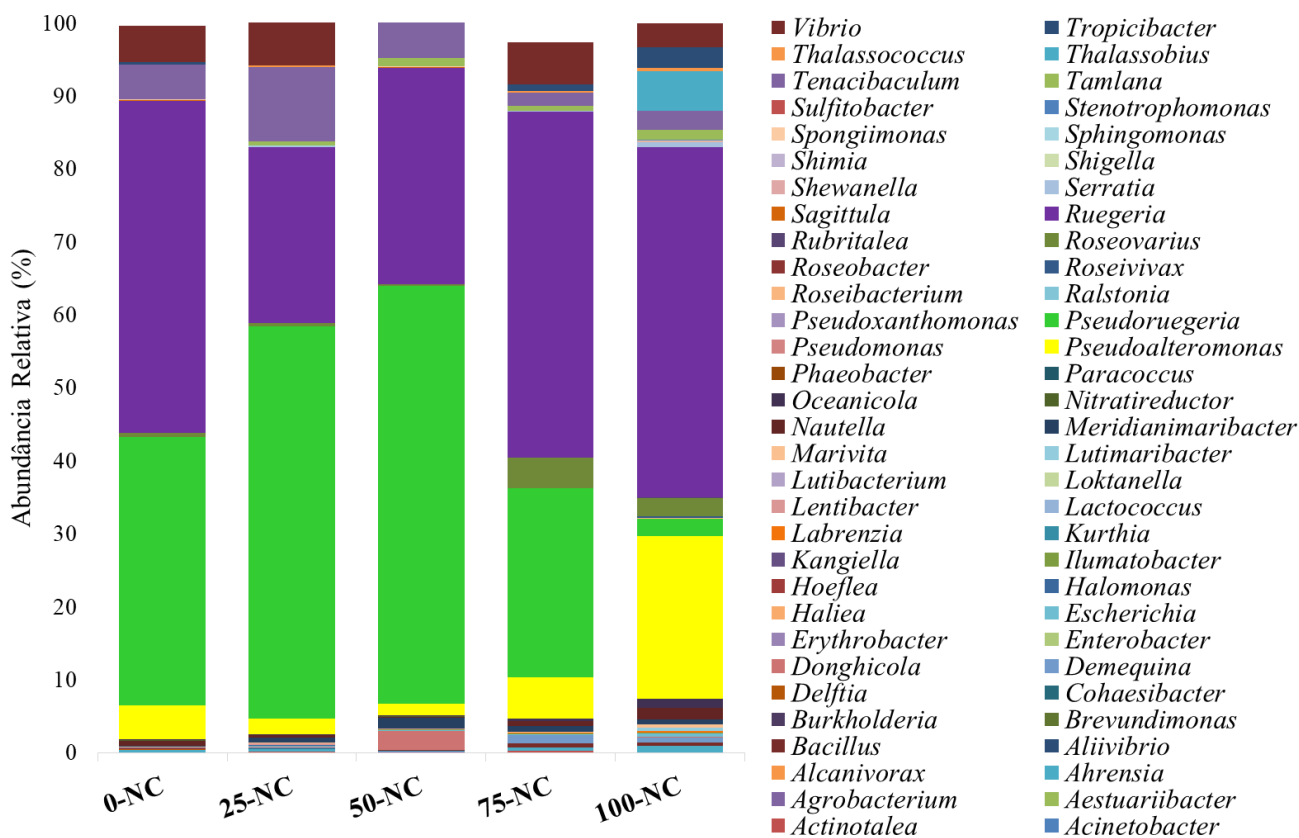


Figura 9. Abundância relativa(%) de gêneros da microbiota intestinal do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de *Nauphoeta cinerea* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 20 dias.

Tabela 4. Abundância relativa(%) de gêneros da microbiota intestinal do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe pela farinha de *Nauphoeta cinerea* (0, 25, 50, 75 e 100%) durante o período de 20 dias.

Gêneros	0-NC	25-NC	50-NC	75-NC	100-NC
<i>Acinetobacter</i>				0,01	
<i>Actinotalea</i>	0,05	0,19		0,23	
<i>Aestuariibacter</i>			0,06		
<i>Agrobacterium</i>			0,07		
<i>Ahrensia</i>	0,31	0,27	0,11	0,47	0,97
<i>Alcanivorax</i>	0,03				
<i>Aliivibrio</i>				0,01	
<i>Bacillus</i>		0,04	0,07	0,57	0,42
<i>Brevundimonas</i>		0,01			
<i>Burkholderia</i>	0,01		0,01		
<i>Cohaesibacter</i>	0,01	0,08			
<i>Delftia</i>	0,01	0,01			0,02
<i>Demequina</i>	0,01	0,11	0,01	1,09	0,65
<i>Donghicola</i>		0,12	2,61		0,08
<i>Enterobacter</i>				0,02	0,03
<i>Erythrobacter</i>			0,02	0,02	
<i>Escherichia</i>	0,06	0,14	0,12	0,07	0,45
<i>Haliaea</i>	0,01				
<i>Halomonas</i>	0,02	0,02		0,02	
<i>Hoeflea</i>	0,01				
<i>Ilumatobacter</i>	0,11	0,09	0,12	0,08	0,08
<i>Kangiella</i>	0,02			0,08	0,02
<i>Kurthia</i>					0,02
<i>Labrenzia</i>	0,01			0,01	0,17
<i>Lactococcus</i>				0,01	
<i>Lentibacter</i>	0,06	0,19	0,05	0,04	0,05
<i>Loktanella</i>		0,01			
<i>Lutibacterium</i>					0,03
<i>Lutimaribacter</i>	0,01		0,01	0,03	0,46
<i>Marivita</i>	0,02	0,05	0,01	0,05	0,41
<i>Meridianimaribacter</i>	0,18	0,68	1,52	0,86	0,68
<i>Nautella</i>	0,61	0,36	0,14	0,68	1,63
<i>Nitratireductor</i>	0,14		0,02	0,02	
<i>Oceanicola</i>	0,1	0,17	0,18	0,27	1,18
<i>Paracoccus</i>					0,01
<i>Phaeobacter</i>					0,01
<i>Pseudoalteromonas</i>	4,67	2,07	1,55	5,64	22,31
<i>Pseudomonas</i>	0,01	0,01			
<i>Pseudoruegeria</i>	36,78	53,74	57,28	25,9	2,4
<i>Pseudoxanthomonas</i>		0,01			
<i>Ralstonia</i>		0,01			
<i>Roseibacterium</i>					0,1
<i>Roseivivax</i>	0,01			0,02	0,16
<i>Roseobacter</i>				0,01	

<i>Roseovarius</i>	0,58	0,43	0,2	4,16	2,58
<i>Rubritalea</i>	0,01	0,04			0,02
<i>Ruegeria</i>	45,48	24,06	29,7	47,43	47,98
<i>Sagittula</i>	0,03	0,02	0,04	0,03	0,08
<i>Serratia</i>	0,09	0,19	0,08	0,06	0,69
<i>Shewanella</i>					0,02
<i>Shigella</i>					0,01
<i>Shimia</i>	0,01				
<i>Sphingomonas</i>		0,03			
<i>Spongiimonas</i>	0,02	0,09	0,02	0,04	0,16
<i>Stenotrophomonas</i>			0,02		0,06
<i>Sulfitobacter</i>				0,06	0,02
<i>Tamlana</i>	0,04	0,5	1,15	0,66	1,36
<i>Tenacibaculum</i>	4,72	10,16	6,19	1,82	2,67
<i>Thalassobius</i>		0,03			5,34
<i>Thalassococcus</i>	0,04	0,2	0,06	0,16	0,52
<i>Tropicibacter</i>	0,34	0,04	0,27	0,97	2,77
<i>Vibrio</i>	4,99	5,87	0,81	5,77	3,34

5. DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS DO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE PENEÍDEOS ALIMENTADOS COM *N. CINEREA*

Diversos trabalhos vêm utilizando insetos como fonte proteica, inclusive em peixes ornamentais como *Amphiprion ocellaris*, onde não foi observado resultados negativos de crescimento, resposta ao estresse e sobrevivência quando alimentado com *Hermetia illucens* (Vargas-Abúndez et al., 2019). Belghit et al. (2018) também não encontraram diferença no desempenho de crescimento alimentando *Salmo salar* (salmão) com a larva da mesma mosca em relação à farinha de peixe. Em bagre, *Clarias gariepinus*, quando alimentado com o inseto *T. molitor*, foi observado que uma substituição de até 80% de farinha de inseto não prejudica o crescimento (Ng et al., 2001). Em tilápia (*Oreochromis niloticus*) foram encontrados resultados positivos somente no estágio juvenil com o mesmo inseto (Sánchez-Muros et al, 2017). No pargo japonês, *Pargus major*, foi visto que fatores relacionados ao sistema imune (desafiados com bactérias) também foram melhorados quando os animais foram alimentados com *T. molitor* (Ido et al., 2019). Rema et al. (2019) também observaram resultados positivos em relação ao desempenho zootécnico em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com larvas de *T. molitor*.

Com uma dieta a base do inseto *T. molitor* sem lipídios, Motte et al. (2019) observaram que a farinha de inseto ocasionou uma melhora no desempenho zootécnico do camarão *L. vannamei*. Rahimnejad et al. (2019) com dietas a base de larcas do bicho-da-seda (*B. mori*), sem lipídios, relataram resultados positivos em relação ao desempenho zootécnico, capacidade antioxidante, digestibilidade do fósforo e redução do tempo de muda. De acordo com os autores, esses resultados devem estar relacionados com a presença da quitina dos insetos. Além disso, há relatos de quitina do *B. mori* ativar o sistema imune inato do camarão (Ali et al., 2018).

Panini et al. (2017b), alimentando a mesma espécie de peneídeo usado no presente trabalho com farinha de larva do inseto *T. molitor*, também não encontraram diferenças significativas em critérios zootécnicos. Além disso, os autores abservaram que a substituição da farinha de peixe por larvas de *T. molitor* não alterou características como textura e cor do peneídeo.

O mesmo foi observado neste trabalho quando substituída a farinha de peixe por farinha de *N. cinerea* não sendo observada diferença significativa de parâmetros zootécnicos como ganho de peso, taxa de crescimento específico e sobrevivência (Fig. 1). Além disso, foi

observado um aumento significativo de proteína bruta (base seca) em relação a composição centesimal do camarão (Tabela 1). Alguns autores afirmam que a concentração proteica da dieta pode atuar como modulador positivo contra agentes estressores relacionados à qualidade de água, como níveis baixos de salinidade (Martínez-Antônio et al., 2019).

Além disso, foi observado que em condições de estresse relacionado ao pH, há alteração na composição da microbiota, indução do estresse oxidativo e redução na atividade das enzimas digestivas amilase, lipase e tripsina (Duan et al., 2019). Em nossos resultados não foi possível relacionar os parâmetros de qualidade de água com atividade de enzimas digestiva, estresse oxidativo e resposta imune, já que a qualidade de água foi mantida conforme o ideal para a espécie, sendo assim, os resultados destas análises não foram associados a mudanças físicas e químicas de qualidade de água.

5.2 ASPECTOS DA DIGESTÃO EM PENEIDEOS ALIMENTADOS COM FARINHA DE *N. CINEREA*

Os níveis de expressão de tripsina e quimotripsina podem ser modulados por diversos fatores (além dos genéticos) e entre eles estão a quantidade e a qualidade da proteína da dieta (Le Moullac et al. 1996). Além disso, essa mudança de atividade pode resultar em informações sobre a assimilação proteica benéfica para os camarões (Hernández e Murueta, 2009). A metamorfose também pode influenciar na atividade e nos níveis de expressão gênica para adaptação das dietas, já que em camarões até a fase juvenil ocorre uma modificação muito grande de componentes alimentares, principalmente nas fases larvais, como zooplâncton e fitoplâncton (Jones et al., 1997; Wei et al., 2014). Contudo, fatores como a qualidade e a quantidade de proteína, a suplementação da dieta, fatores abióticos, além da muda também influenciam nesses níveis de atividade. Este último se dá por conta de hormônios que podem regular a secreção de enzimas como tripsina e quimotripsina (Muhlia-Almazán e García-Carreno, 2002; Hernández e Murueta, 2009). Outros fatores como onde foi obtido o extrato enzimático (*hepatopâncreas*, fezes, intestino médio) também pode causar essa variação de atividade, e por fim a falta de alimento no trato digestório (Hernández e Murueta, 2009).

Nossos achados permitiram observar que em relação as enzimas tripsina e quimotripsina não apresentaram uma alteração significativa de atividade específica entres os diferentes níveis de substituição de farinha de *N. cinerea*, quando comparados com a dieta controle (farinha de

peixe), sugerindo que não houve mudanças significativas na qualidade e quantidade de proteína entre todas as dietas testadas. Similarmente aos nossos resultados, Belghit et al. (2018) também não encontraram diferença na atividade de tripsina alimentando *S. salar* (salmão) com a larva da mosca-soldado-negro *H. illucens*. Além disso, Li et al. (2017) também não encontraram diferença significativa das atividades de tripsina, amilases, lipases alimentando carpas Jian (*Cyprinus carpio* var. Jian) com larvas do mesmo inseto. Por outro lado, Rapatsa e Moyo (2017) observaram aumento de proteases e amilases com o aumento do nível de substituição de *Imbrasia belina* em dietas de *Oreochromis mossambicus*. Contudo, os autores não observaram diferença na atividade das lipases entre o controle e o maior nível de substituição.

Na literatura foram observados resultados semelhantes de atividade específica das enzimas quimotripsina, tripsina, e α -amilase no hepatopâncreas de *L. vannamei*, aos encontrados neste trabalho, com uma suplementação de proteína (Alexandre et al., 2014), polissacarídeo de microalga (Ozório et al., 2013) e recentemente substituição de *T. molitor* na dieta (Rios et al., 2021).

Os triglicerídeos atuam como reserva de energia em animais e não estão presentes nas estrutura das membranas. Em vertebrados, os adipócitos, armazenam uma grande quantidade de triglicerídeos. As gorduras são oxidadas, fornecendo uma grande quantidade de energia, mais do que os carboidratos e as proteínas (Nelson e Cox, 2014; Hori, 2015). A lipase já foi purificada e caracterizada em peneídeos, e foi observado que em *L. vannamei* há expressão da enzima lipase no hepatopâncreas e em outras partes do corpo com função de mobilização de reservas energéticas sob condição de jejum (Rivera-Pérez et al. 2010; Rivera-Pérez e García-Carreño, 2011). O presente trabalho não observou diferença significativa na atividade específica da enzima lipase (Fig. 3).

Embora em dietas de peixes e camarões os carboidratos sejam nutricionalmente menos importantes quando comparados com a proteína, eles são utilizados como fonte nutricional. Nossos resultados demonstraram que em relação a atividade específica da enzima α -amilase, não foi encontrada diferença significativa entre os diferentes níveis de substituição a base de farinha de *N. cinerea* e a dieta controle (farinha de peixe). Assim como as atividades específicas das α -amilases (Fig. 4) foi observado através do zimograma a atividade da enzima α -amilase (Fig. 5) e o perfil de proteínas no hepatopâncreas do camarão, um perfil semelhante de bandas (Fig. 6).

5.3 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE PENEÍDOS ALIMENTADOS COM FARINHA DE *N. CINEREA*

Foi observado que aumento da atividade e da expressão das enzimas SOD e CAT em *Marsupenaeus japonicus* sob estresse de nitrito (Zheng et al., 2019) e aumento na expressão dessas enzimas em *L. vannamei* sob estresse de temperatura (Zhou et al., 2010). No presente estudo não foram observadas variações significativas na atividade da enzima antioxidante CAT, o que indica que a dieta a base de farinha de *N. cinerea* não ocasionou danos oxidativos no *hepatopâncreas* do camarão. Por outro lado, Li et al. (2017) alimentando Jian carpa (*Cyprinus carpio* var. Jian) com larva de mosca-soldado-negro sem lipídio, observaram aumento na atividade da enzima CAT, no entanto, não foram observadas diferenças na atividade de SOD. Henry et al. (2018) observaram redução da peroxidação lipídica, com aumento da atividade das enzimas antioxidante (CAT e SOD) com dieta parcial em truta-arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, com larvas de *T.molitor* e os autores sugerem que a presença da quitina seja um imunoestimulante.

Ainda podemos constatar que a alta sobrevivência encontrada no presente estudo deve refletir um estado saudável e ainda uma maior tolerância ao estresse nos camarões alimentados comas dietas contendo farinha de *N. cinerea*. Na literatura foram observados resultados semelhantes de título de aglutinação da hemolinfa, contagem de hemócitos, concentração de proteína na hemolinfa e atividade PO no *hepatopâncreas* de *L. vannamei*, aos encontrados neste trabalho, quando suplementando a dieta com algas (Schleder et al., 2018).

As respostas imunológicas em camarões são divididas em humoral e celular. As respostas humorais como por exemplo, a SOD, CAT, lisozimas, peroxidase e as lectinas. As lectinas são proteínas sem função catalítica, que são responsáveis pela fagocitose através da opsonização, que consiste em um importante mecanismo contra vírus e bactérias, pelo qual elas tem a capacidade de ligar-se a carboidratos específicos por afinidade e provocar aglutinação de patógenos. Acredita-se que são sintetizadas pelos hemócitos e desencadeam uma série de reações de defesas, entre elas a fagocitose e possível a ativação do sistema proPO, estudadas inclusive em insetos (Marques e Barracco, 2000).

A lectina tipo C que em suma funciona como uma PRP (Receptores de Reconhecimento Padrão) para bactérias através da interação com o LPS (lipopolissacarídeos). As LPS são componentes celulares de bactérias gram-negativas em sua maioria *Vibrios*, e já foi observado

que podem causar danos no tecido do intestino e redução da atividade das enzimas digestivas como amilase, tripsina e lipase em peneídeos; além do aumento da atividade e regulação de expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo como a fenoloxidase, quando em estresse ambiental por amônia e nitrito (Duan et al., 2018).

As lectinas atuam em atividade aglutinante contra bactéria também em *Penaeus monodon* (Luo et al., 2006) presentes na maiorias das espécies de camarões peneídeos (Li e Xiang, 2013). No presente estudo foi observado que esse mecanismo importante do sistema imunológico dos camarões *L. vannamei* não foi afetado pela substituição de farinha de peixe por farinha de *N. cinerea*, nas dietas testadas (Fig. 7b). É importante ressaltar que no processo de ativação do sistema proPO, ocorre a geração de intermediários reativos como espécies reativas de oxigênio ou espécies reativas de nitrogênio que provocam atividade citotóxica contra patógenos (Amparyup et al., 2013). Neste trabalho constatamos que a substituição de farinha de *N. cinerea* não influenciou na atividade da fenoloxidase (Fig 7c). Também foi possível evidenciar que não houve diferença significativa entre o controle (*fishmeal*) e os diferentes níveis de substituição de farinha de *N. cinerea*, em relação a ativação de respostas imune como contagem de hemócitos(Fig.7a) e quantidade de proteína na hemolinfa(Fig.7d).

5.4 EFEITO DA FARINHA DE *N. CINEREA* NA MICROBIOTA INTESTINAL

A microbiota intestinal presente em peneídeos participa de funções vitais, inclusive funções metabólicas, na resistência a patógenos e no sistema imune, por meio de uma série de cascatas de sinalização e interação entre hospedeiro e bactéria (Hughes e Sperandio, 2008). Gao et al. (2019) observaram por metagenômica, que a microbiota possuía potencial para produzir várias enzimas digestivas, o que indicou os possíveis papéis da microbiota no metabolismo de nutrientes do hospedeiro. O presente estudo comparou as diferentes comunidades bacterianas em amostras do conteúdo intestinal de camarões alimentados com farinha de *N.cinerea* em relação ao controle. No presente trabalho os filos dominantes foram: *Proteobacteria*, *Bacteriodetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia* e *Planctomycetes*, nesta ordem.

Em rã (*Rana Lithobates*) *catesbeiana* alimentada com *Musca domestica* Li et al. (2019) encontraram também como filo dominante *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteriodetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, entre outras. Além disso, não foram encontradas alterações significativas na abundância de espécies e filos bacterianos entre os tratamentos.

Recentemente, Fan et al. (2019) relacionaram o desempenho de crescimento com microbiota em *L. vannamei*. Os autores observaram que o filo *Actinobacteria* estava presente em animais com desempenho de crescimento normal, já o filo *Proteobacteria* sendo relacionado com redução de desempenho. Essa relação de desempenho de crescimento e microbiota semelhante também foi observada em larvas de peixes (Forberg et al., 2016). Shao et al. (2019) também encontraram um perfil de microbiota semelhante, quando substituindo farinha de peixe por farelo de soja em dietas para *L. vannamei*, e não observaram alterações na microbiota, sendo que o filo dominante também foi o *Proteobacteria*. Os autores não encontraram relação da microbiota com o metabolismo energético e desempenho de crescimento. No camarão *P. monodon* foi encontrado um perfil semelhante de microbiota, aos nossos resultados (Oteama et al., 2016) e em Rios et al. (2021) com *L. vannamei* alimentado com diferentes níveis de substituição de *Tenebrio molitor*.

Recentemente Wang et al. (2019) observaram um aumento significativo no filo *Proteobacteria* enquanto as *Bacteroidetes* foram reduzidas quando os camarões da espécie *L. vannamei* foram desafiados com WSSV. Os autores observaram um aumento significativo das bactérias patogênicas, que causam um desequilíbrio no hospedeiro, ou seja uma interrupção das funções e da estabilidade do intestino (Duan et al., 2018). Com relação às bactérias patogênicas encontradas com frequência em camarões de cultivo como: *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, e *Vibrio tubiashii*, não foi observada uma relação de redução da bactérias conforme o nível de substituição da farinha de barata foi aumentando, nem quando comparado com o controle (Fig. 9 e Tabela 4). Os parâmetros imunológicos também não foram relacionados com o perfil da microbiota. Foi observada também a presença de bactérias benéficas no intestino de *L. vannamei*, como *Lactobacillus vaccinoferus*; inclusive algumas espécies desse gênero são utilizadas como probióticos na aquicultura (Zheng et al., 2017). No entanto, foi observado que no nível de substituição 100% apresentou um perfil diferente dos demais níveis de substituição, fato que pode estar relacionado com a presença de quitina dos insetos (Antonopoulou et al., 2019; Rahimnejad et al., 2019). Contudo, em trabalho elaborado por Zhang et al. (2014), observou-se que diferentes fontes de lipídios também podem alterar a microbiota. Mais estudos serão necessários para melhor compreensão entre os efeitos de quitina, lipídeos e outros componentes da farinha de *N. cinerea* e a microbiota de *L. vannamei*.

6. CONCLUSÕES

É constante a busca por novas fontes de proteínas para alimentação humana e animal, levando em conta a escassez dos recursos naturais disponíveis, a poluição e o alto valor econômico. Neste sentido, a utilização de insetos em rações mostrou-se promissora por diversos fatores já abordados. No presente estudo foi observado que a substituição com dietas experimentais utilizadas para alimentar o camarão *L. vannamei* contendo diferentes níveis de substituição da farinha de peixe pela farinha de *N. cinerea*, não alterou o desempenho zootécnico dos camarões, em relação à sobrevivência, ao crescimento e ao ganho de peso. Além disso, foi observado um aumento significativo de proteína na composição centesimal do camarão. Outro fator importante é que não houve a necessidade de adição de aminoácidos como a metionina, o que ocorre geralmente em rações experimentais sem farinha de peixe, resultados esses que são promissores para a carcinicultura.

Os resultados demonstraram que não houve alterações significativas nas atividades específicas das proteases, lipases e α -amilases ensaiadas. Além disso, não houve alterações significativas nos parâmetros imunológicos e de estresse oxidativo. Assim como os zimogramas de atividade amilásica apresentaram um padrão de bandas semelhantes nas amostras de todas os tratamentos e os géis SDS-PAGE de proteínas apresentaram um padrão de bandas semelhantes, sugerindo não haver alterações significativas na composição das proteínas da hemolinfa. Em relação à composição da microbiota intestinal, foi observado que o nível de substituição 100% apresentou um perfil mais diversificado que os demais níveis de substituição.

Em conjunto, os resultados obtidos nesta Tese mostram que é viável, do ponto de vista de desempenho zootécnico, a substituição total de farinha de peixe por farinha de ninfas de *N. cinerea* na alimentação de juvenis do camarão-branco-do-Pacífico *L. vannamei*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTONI, E.F.; PALMA-SILVA, C.; ESTEVES, F.A. Natural diet of three species of shrimp in a Tropical Coastal Lagoon. *Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.46, n. 3, p. 395-403, 2003.

ALEXANDRE, D.; OZÓRIO, R. A.; DERNER, R.B.; FRACALOSI, D. M.; OLIVEIRA, G.B.; SAMUELS, R.I.; TERRA, W. R.; SILVA, C.P. Spatial distribution of digestive proteinases in the midgut of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) indicates the existence of endo-ectoperitrophic circulation in Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 172-173, p. 90-95, 2014.

ALEXANDER, P.; BROWN, C.; DIAS, C.; FINNIGAN, J.; MORAN, D.; ROUNSEVELL, M. D. A. Could consumption of insects, cultured meat or imitation meat reduce global agricultural land use?. *Global Food Security*, v. 15, p. 22-32, 2017.

ALI, M. F. Z.; YASIN, I. A.; OHTA, T.; HASHIZUME, A.; IDO, A.; TAKAHASHI, T.; MIURA, C.; MIURA, T. The silkrope of *Bombyx mori* effectively prevents vibriosis in penaeid prawns via the activation of innate immunity. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1-8, 2018.

ALLEN, K. M.; HABTE-TSION, H. THOMPSON, K. R.; FILER, K.; TIDWELL, J. H.; KUMAR, V. Freshwater microalgae (*Schizochytrium sp.*) as a substitute to fish oil for shrimp feed. *Scientific Reports*, v. 9, 2019.

AL-MOHANNA, S. Y.; NOTT, J. A.; LANE, D. J. W. Mitotic E- and secretory F- cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, v.65, p. 901-910, 1985.

ADEDARA, I A.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, D.; FAROMBI, E. O.; ASCHNER, M.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B.T. Neurobehavioral and biochemical changes in *Nauphoeta*

cinerea following dietary exposure to chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, v.130: 22-30, 2016.

AMPARYUP, P.; CHAROENSAPSRI, W.; TASSANAKAJON, A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 34, p. 990-1001, 2013.

ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. Cultivo de camarões marinhos. *Aquicultura: experiências brasileiras*. Capítulo 8, p.199-219, 2004.

ANTONOPOULOU, E.; NIKOULI, E.; PICCOLO, G.; GASCO, L.; GAI, F.; CHATZIFOTIS, S.; MENTE, E.; KORMAS, K. A. Reshaping gut bacterial communities after dietary *Tenebrio molitor* larvae meal supplementation in three fish species. *Aquaculture*, v.503, p. 628-635, 2019.

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L.M.; ROSA, R.D. Avances en la Inmunología del Camarón. *Guía Técnica-Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. Capítulo 6, p. 237-288, 2014.

BARBIERI, J. R. C.; OSTRENSKY, N. A. Camarões marinhos - Engorda. *Aprenda Fácil*, Volume 2, p.370,2002.

BARRACCO, M.A; PERAZZOLO, L.M; ROSA, R.D. Inmunología del camarón. In: VIELKA, M.Q; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.), *Guía Práctica de Patología y Inmunología de Camarones Penaeidos*, CYTED, 2008, p. 169-224.

BARROSO, F. G.; HARO, C.; SÁNCHEZ-MUROS, M.; VENEGAS, E.; MARTÍNEZ-SANCHES, A.; PÉREZ-BANÓN, C. The potencial of insect species for use as food for fish. *Aquaculture*, v. 422-423, p. 193-201.2014.

BELGHIT, I.; LILAND, N. S.; WAAGBO, R.; BIANCAROSA, I.; PELUSIO, N.; LI, Y; KROGDAHL, A.; LOCK, E. J. Potencial of insect-based diets for Atlantic salmon (*Salmo solar*). *Aquaculture*, v. 491, p. 72-81, 2018.

BOYD, C. E., GAUTIER, D. Effluent composition and water quality standards. *Global Aquaculture Advocate*, v. 3, p. 61–66, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCHON, N.; SILVERMAN, N.; CHERRY, S. Immunity in *Drosophila melanogaster* from microbial recognition to whole organism physiology. *Nat. Rev. Immunol*, v. 14, p. 796-810, 2014.

C. JOBIN. GPR109a: The missing link between microbiome and good health? *Immunity*, v.40, p. 8-10, 2014.

CAPORASO, J.G., LAUBER, C.L., WALTERS, W. A., BERG-LYONS, D., HUNTLEY, J., FIERER, N., OWENS, S. M., BETLEY, J., FRASER, L., BAUER, M., GORMLEY, N., GILBERT, J. A., SMITH, G., & KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, v. 6, p. 1621–1624, 2012.

CAPORASO, J.G., KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J., BITTINGER, K., BUSHMAN, F.D., COSTELLO, E.K., FIERER, N., PEÑA, A.G., GOODRICH, J.K., GORDON, J.I., HUTTLEY, G.A., KELLEY, S.T., KNIGHTS, D., KOENIG, J.E., LEY, R.E., LOZUPONE, C.A., MCDONALD, D., MUEGGE, B. D, PIRRUNG, M., REEDER, J., SEVINSKY, J. R., TURNBAUGH, P. J., WALTERS, W. A., WIDMANN, J., YATSUNENKO, T., ZANEVELD, J., KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data. *Nature Methods*, v. 7(5), p. 335-336, 2010.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; AGUILAR, J. G. S.; DOMINGUES, M. A. F. Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. *Trends in Food Science & Technology*, v.76, p.82-89, 2018.

CECCALDI, H. J. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. *Advances in Tropical Aquaculture*, v. 9, p. 243-259, 1989.

COSTA, da D. V. Insetos como alimento para aquicultura: devaneio ou realidade?. *Panorama da aquicultura*, v. 29, n.171, p.50-57, 2019.

CUZON, G.; LAWRENCEB, A. GAXIOLAC, G.; ROSAS, C.; GUILLAUMED, J. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, v. 235 p. 513–551, 2004.

CYRINO, J. E. P.; FRACALOSSO, D. M. Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013, p. 375.

DELMAR, E.G.; LARGMAN, C.; BRODRICK, J.W.; GEOKAS, M.C. A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Analytical Biochemistry*, v. 99, p. 316-320, 1979.

DOTTA, G.; PIAZZA, R. S. Manejo e Sanidade no Cultivo. Instituto Federal do Paraná para o Sistema Escola Técnica Aberta do Brasil e-Tec Brasil, 2012, p. 136.

DUAN, Y.; LIU, Q.; WANG, Y.; ZHANG, J.; XIONG, D. Impairment of the intestine barrier function in *Litopenaeus vannamei* exposed to ammonia and nitrite stress. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 78, p.279-288, 2018.

DUAN, Y.; WANG, Y.; LIU, Q.; ZHANG, J.; XIONG, D. Changes in the intestine barrier function of *Litopenaeus vannamei* in response to pH stress. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 88, p.142-149, 2019.

DUGASSA, H.; GAETAN, D. G. Biology of White Leg Shrimp, *Penaeus vannamei*: Review. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, v. 10, p.5-17, 2018.

ERLANGER, B.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.95, p. 271–278, 1961.

FAN, J.(a); CHEN, L.; MAI, G.; ZHANG, H.; YANG, J.; DENG, D.; MA, Y. Dynamics of the gut microbiota in developmental stages of *Litopenaeus vannamei* reveal its association with body weight. *Scientific Reports*, v. 9, p. 1-10, 2019.

FAN, L.(b); WANG, Z.; CHEN, M.; QU, Y.; LI, J.; ZHOU, A.; XIE, S.; ZENG, F.; ZOU, J.b Microbiota comparison of Pacific white shrimp intestine and sediment at freshwater and marine cultured environment. *Science of the Total Environment*, v. 657, p.1194-1204, 2019.

FAN, L.; LI, Q. X. Characteristics of intestinal microbiota in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* differing growth performances in the marine cultured environment. *Aquaculture*, v. 505 , p.450-461, 2019.

FAO 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, p. 218.

FAO 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, p. 230.

FAO 2013. Edible insects: future prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, p. 201.

FAO 2017. .The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, p. 64.

FELGENHAUER, B. E. Internal Anatomy of the Decapods: An Overview. *Rev. Microscopic Anatomy of Invertebrates*, v. 10, p. 45-75, 1992.

FINKE, M. D. Estimate of chitin raw whole insects. *Zoo Biology*, v.26, p.105-115, 2007.

FORBERG, T.; SJULSTAD, E. B.; BAKKE, I.; OLSEN, Y.; HAGIWARA, A.; SAKAKURA, Y.; VADSTEIN, O. Correlation between microbiota and growth in Mangrove Killifish

(*Kryptolebias marmoratus*) and Atlantic cod(*Gadus morhua*). Scientific Reports, v.6, p.1-9, 2016.

GAO, S.; PAN, L.; HUANG, F.; SONG, M.; TIAN, C.; ZHANG, M. Metagenomic insights into the structure and function of intestinal microbiota of farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture, v. 499, p 109-118, 2019.

GASCO, L.; FINKE, M.; HUIS, van A. Can diets containing insects promote animal health? Journal of Insects as Food and Feed, v 4, p1-4, 2018.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. Insetos: fundamentos da entomologia. 5 edição. Rio Janeiro: ROCA, 2017, p.912.

HENRY, M. A.; GAI, F.; ENES, P.; PERÉZ-JIMÉNEZ, A.; GASCO, L. Effect of parcial dietary replacement of fishmeal by yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae meal on the innate immune response and intestinal antioxidant enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunology, v. 83, p. 308-313, 2018.

HENRY, M.; GASCO, L.; PICCOLO, G.; FOUNTOULAKI, E. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. Animal Feed Science and Technology, v. 203, p. 1-22, 2015.

HERNÁNDEZ, J. C. S.; MURUETA, J. H. C. Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, v.290, p. 190-195, 2009.

HORI, J. Bioquímica, 1.Ed. Rio de janeiro: SESES, 2015, 128p.

HUGHES, D. T.; SPERANDIO, V. Inter-kingdom signaling: communication between bacteria and their hosts. Nat. Rev. Microbiol., v.6, p.11-120, 2008.

HUIS, van A. Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. Entomol, v.58, p. 563-583, 2012.

IDO, A.; HASHIZUME, A.; OHTA, T.; TAKAHASHI, T.; MIURA, C.; MIURA, T. Replacement of fish meal by defatted yellow mealworm(*Tenebrio molitor*) larvae in diet improves growth performance and disease resistance in red seabream(*Pargus major*). *Animals*, v. 9, p. 1-12, 2019.

JARAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunology*, v.211, p.213-236, 2006.

JONES, D. A.; KUMLU, M.; VAY, L. L.; FLETCHER, D. J. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. *Aquaculture*, v. 155, p.285-295, 1997.

KATAYAMA, N.; ISHIKAWA, Y.; TAKAOKI, M.; YAMASHITA, M.; NAKAYAMA, S.; KIGUCHI, K.; KOK, R.; WADA, H.; MITSUHASHI, J. Entomophagy: A key to space agriculture. *Advances in Space Research*, v. 41, p. 701-705, 2008.

KLEIN, B.; LE MOULLAC, G.; SELLOS, D.; VAN WORMHOUDT, A. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v.28, p.551-563, 1996.

LABREUCHE, Y.; WARR, G. W. Insights into the antiviral functions of the RNAi machinery in panaeid shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, v.34, p.1002-1010, 2013.

LAEMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.

LE MOULLAC, G., KLEIN, B., SELLOS, D., VAN WORMHOUDT, A. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* v. 208, 107–125, 1996.

LI, F.; XIANG, J. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 34, p.973-980, 2013.

LI, H.; WANG, S.; CHEN, Y.; LU, K.; YIN, B.; LI, S.; HE, J.; LI, C. Identification of two p53 isoforms from *Litopenaeus vannamei* and their interaction with NF-Kb to induce distinct immune response. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1-13, 2017.

LI, L. Y.; ZHAO, Z. R.; LIU, H. Feasibility of feeding yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.) in bioregenerative life support systems as a source of animal protein for humans. *Acta Astronautica*, v. 92, p.103-109, 2013.

LI, S.; JI, H.; ZHANG, B.; ZHOU, J.; YU, H. Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in diets for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Growth performance, antioxidant enzyme activities, digestive enzyme activities, intestine and histological structure. *Aquaculture*, v.477, p.62-70, 2017.

LI, X.; RAHIMNEJAD, S.; WANG, L.; LU, K.; SONG, K.; ZHANG, C. Substituting fish meal with housefly (*Musca domestica*) maggot meal in diets for bullfrog *Rana (Lithobates) catesbeiana*: Effects on growth, digestive enzymes activity, antioxidant capacity and gut health. *Aquaculture*, v.499, p. 295-305, 2019.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 106, p. 110-130, 2011.

LIU, H.; SÖDERHÄLL, K.; JARAVANICHPAISAL, P. Antiviral immunity in crustaceans. *Fish & Shellfish Immunology*, v.27, p.79-88, 2009.

LOBATO, R. O.; NUNES, S. M.; WASIELESKY, W.; FATTORINI, D.; REGOLI, F.; MONSERRAT, J. M.; LIMA-VENTURA, J. The role of lipoic acid in the protection against of metallic pollutant effects in the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.165, p. 491–497, 2013.

LUO, T.; YANG, H.; LI, F.; ZHANG, X.; XU, X. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 30, p. 607-617, 2006.

MANINGAS, M. B. B.; KONDO, H.; HIRONO, I. Molecular mechanisms of the shrimp clotting system. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 34, p. 968-972, 2013.

MARQUES, M. R. F.; BARRACCO, M. A. Lectins, as non-self-recognition factors in crustaceans. *Aquaculture*, 191, p. 23-44, 2000.

MARTÍNEZ-ANTONIO, E.M.; RACOTTA, I.S.; RUCALCABA-MÁRQUEZ, J.C.; MAGALLÓN-BARAJAS, F. Modulação da resposta ao estresse e desempenho produtivo de *Litopenaeus vannamei* por meio da dieta. *Aquatic biology*, 2019.

MEYER-ROCHOW, V. B.; CHAKRAVORTY, J. Notes on entomophagy and entomotherapy generally and information on the situation in India in particular. *Appl. Entomol Zool*, v. 48, p. 105-112, 2013.

MOTTE, C.; RIOS, A.; LEFEBVRE, T.; DO, H.; HENRY, M.; JINTASATAPORN, O. Replacing fish meal with defatted insect meal (yellow mealworm *Tenebrio molitor*) improves the growth and immunity of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Animals*, v. 258, p.1-12 2019.

MUHLIA-ALMAZÁN, A., SÁNCHEZ-PAZ, A.; GARCÍA-CARREÑO, F. L. Invertebrate trypsins: a review. *Journal of Comparative Physiology B*, v.178, p.655-672, 2008.

MUHLIA-ALMAZÁN, A.; GARCÍA-CARREÑO, F. L. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Panaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, v. 133, p. 383-394, 2002.

NAVARRETE-DEL-TORO, M. A.; GARCÍA-CARRENO, F. L.; HERNÁNDEZ-CORTÉZ, P.; MOLNÁR, T.; GRÁF, L. Biochemical characterisation of chymotrypsin from the midgut gland of yellowleg shrimp, *Panaeus californiensis*. *Food Chemistry*, v.173, p.147-155, 2015.

NELSON, David L.; COX, Michael M. princípios de bioquímica, 6. ed. Porto Alegre: Artmed,

2014, 1298p.

NG, W-K; LIEW, F-L; ANG, L-P; WONG, K-W. Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Research*, v.32, p.273-280, 2001.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques. III. amilase: dosage d'activité et contrôle de l'absence amilase. *Helv.Chim Acta*. v.31, p.286-290, 1948.

NRC (2011). NATIONAL RESEARCH COUNCIL (ESTADOS UNIDOS); Committee on Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C.: National Academic Press, 2011, p. 376.

NUNES, A. J. P.; CARMO E SÁ, M. V. C.; NETO, H. S. As próximas gerações de ração para camarão marinho. *Panorama da aquicultura*, v. 21, n.123, p.24-35, 2011.

OETAMA, V. S. P.; HENNERSDORF, P.; ABDUL-AZIZ, M.; MROTZEK, G.; HARYANTI, H.; SALUZ, H. P. Microbiome analysis and detection of pathogenic bacteria of *Penaeus monodon* from Jakarta Bay and Bali. *Marine Pollution Bulletin*, v.110, p.718-725, 2016.

OLIVEIRA, L. M.; LUCAS, A. J. S.; CADAVAL, C. L.; MELLADO, M. S. Bread enriched with flour from cinerous cockroach (*Nauphoeta cinerea*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 44, p.30-35, 2017.

OLSEN, R. L.; HASAN, M. R. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, v.27, p.120-128, 2012.

OONINCX, D. G. B.; BOER, I. J. M. Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans- A life cycle assessment. *Plos one*, v. 7, p. 1-5, 2012.

OZÓRIO, R. A.; LOPES, R.G.; GÓES, B. S.; SILVA, C. P.; DERNER, R. B.; FRACALOSI, D. M. Growth and enzymatic profile of the Pacific white shrimp fed with *Porphyridium cruentum* extract. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 41, p.123-131, 2015.

PANINI, R. L.(a); FREITAS, L. E. L.; GUIMARÃES, A. M.; RIOS, C; SILVA, M. F. O.; VIEIRA, F. N; FRACALOSSO, D. M.; SAMUELS, R. I.; PRUDENCIO, E.S; SILVA, C. P.; AMBONI, R.D. M. C. Potential use of mealworms as an alternative protein source for Pacific white shrimp: Digestibility and performance. *Aquaculture*, v. 473 p.115-120, 2017.

PANINI, R. L.(b); PINTO, S. S.; NÓBREGA, R. O.; VIEIRA, F. N; FRACALOSSO, D. M.; SAMUELS, R. I.; PRUDENCIO, E.S; SILVA, C. P.; AMBONI, R.D. M. C. Effects of dietary replacement of fishmeal by mealworm meal on muscle quality of farmed shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Food Research International*, v. 102 p.445-450, 2017.

PREMALATHA, M; ABBASI, T; ABBASI, T; ABBASI, S. A. Energy-efficient food production to reduce global warming and ecodegradation: The use of edible insects. *Renewable and Sustainable Energy. Reviews*, v. 15, p. 4357-4360, 2011.

RAHIMNEJAD, S.; HU, S.; SONG, K.; WANG, L.; LU, K.; WU, R.; ZHANG, C. Replacement of fish meal with defatted silkworm (*Bombyx mori* L.) pupae meal in diets for Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, v.510, p. 150-159, 2019.

RAJOKA, M. S. R.; SHI, J.; MEHWISH, H. M.; ZHU, J.; LI, Q.; SHAO, D.; HUANG, Q.; YANG, H. Interaction between diet composition and gut microbiota and its impact on gastrointestinal tract health. *Food Science and Human Wellness*, v.6, p.121–130, 2017.

RAMOS-ELORDUY, J.; GONZALEZ, E. A.; HERNANDEZ, A. R.; PINO, J. M. Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *Journal Econ. Entomol*, v.95, p. 214-220, 2002.

RAPATSA, M. M. MOYO, N. A. G. Evaluation of *Imbrasia belina* meal as a fishmeal substitute in *Oreochromis mossambicus* diets: Growth performance, histological analysis enzymes activity. *Aquaculture Reports*, v. 5, p.18-26, 2017.

REMA, P.; SARAVANAN, S.; ARMENJON, B.; MOTTE, C. Graded incorporation of defatted yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diet improves growth performance and nutrient retention. *Animals*, v. 9, p. 1-10, 2019.

RIOS, C.; PANINI, R. L.; ACORDI MENEZES, L. A.; VIEIRA, F. N.; FRACALOSSO, D. M.; SAMUELS, R. I.; DE LINDNER, J. de.; SILVA, C. P. Effects of the substitution of fishmeal with mealworm meal on enzymes, haemolymph and intestinal microbiota of the Pacific white shrimp. *Journal of Insects as Food and Feed*, 2021.

RIVERA-PÉREZ, C.; NAVARRETE-DEL-TORO, M. A.; GARCÍA-CARRENO, F. L. Digestive lipase activity through development and after fasting and re-feeding in the whiteleg shrimp *Panaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 300, p.163-168, 2010.

RIVERA-PEREZ, C; GARCIA-CARRENO, F. Effect of fasting on digestive gland lipase transcripts expression in *Panaeus vannamei*. *Marine genomics*, v. 4, p. 273-278, 2011.

RODRÍGUEZ, J.; LE MOULLAC, G. State of the art immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, v. 191, p. 109-119, 2000.

RUMPOLD, B. A.(a); SCHLUTER, O. K. Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.17, p.1-11, 2013.

RUMPOLD, B. A. (b); SCHLUTER, O. K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Rev. Mol. Nutr. Food*, v. 57, p. 802-823, 2013.

SÁNCHEZ-MUROS, M. J.; HARO, C.; GUIL, J. L.; BARROSO, F. G. Effect of feeding in juvenile tilapia(*Oreochromis niloticus*) with diet contain *Tenebrio molitor* meal (Ordercoleoptera). *Annals of Aquaculture and Research*, v. 3, p.1-12, 2017.

SANTOS, D. S.; ROSA, M. E.; ZANATTA, A. P.; OLIVEIRA, R. S.; ALMEIDA, C. G. M.; LEAL, A. P.; SANZ, M.; FERNANDES, K. A.; SOUZA, V. Q.; ASSIS, D. R.; PINTO, E.; BELO, C. A. D. Corrigendum to “neurotoxic effects of sublethal concentrations of cyanobacterial extract containing anatoxin-a(s) on *Nauphoeta cinerea cinerea* cockroaches”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.171, p.138-145, 2019.

SANTOS-MARCOS, J. A.; PEREZ-JIMENEZ, F.; CAMARGO, A. The role of diet and intestinal microbiota in the development of metabolic syndrome. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.70, p.1-27, 2019.

SHAO, J.; WANG, B.; LIU, M.; JIANG, K.; WANG, L.; WANG, M. Replacement of fishmeal by fermented soybean meal could enhance the growth performance but not significantly influence the intestinal microbiota of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v.504, p. 354-360, 2019.

SHELEDER, D. D.; PERUCH, L. G. B.; POLI, M. A.; FERREIRA, T. H., SILVA, C. P.; ANDREATTA, E. R.; HAYASHI, L.; VIEIRA, F. N. Effect of seaweeds on Pacific white shrimp growth performance, gut morphology, digestive enzymes activity and resistance to spot virus. *Aquaculture*, v. 495 p., 359-365, 2018.

SIEMIANOWSKA, E.; KOSEWSKA, A.; ALJEWICZ, M.; SKIBNIEWSKA, K.A.; POLAK-JUSZAK, L.; JOROCKI, A; JEDRAS, M. Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. *Rev. Agricultural Sciences*, v.4, p. 287-291, 2013.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, v. 11, p.613–619, 2017.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem*, v. 86:7, p.15-48, 2017.

SÖDERHÄLL, K.; HÄLL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *BBA - General Subjects*, v. 797, p. 99–104, 1984.

SOONTHORNCHAI, W.; RUNGRASSAMEE, W.; KAROONUTHAISIRI, N; JARAYABHAND, P.; KLINBUNGA, S.; SÖDERHÄLL, K.; JIRAVANICHPAISAL, P. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 34, p.19–28, 2010.

SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, v.191, p.53-69, 2000.

STERNTIFORD, G.D.; NEIL, D.M.; PEELER, E.J.; SHIELDS, J. D.; SMALL, H. J.; FLEGEL, T.W.; VLAK, J. M.; JONES, B.; MORADO, F.; MOSS, S.; LOTZ, J.; BARTHOLOMAY, L.; BEHRINGER, D. C.; HAUTON, C.; LIGHTENERM, D. V. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.110, p141-157, 2012.

STRICKLAND, J. D. H.; Parsons, T.R. A practical handbook of seawater analysis. 2. ed. Ottawa: Fisheries Research Board of Canadá, 1972, p.310.

SUÁREZ, J. A. et al. Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*, v. 289, p.118-123, 2009.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, v. 285, p. 146-158, 2008.

TERRA, W. R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v.47, p.47 – 61, 2001.

TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C.; RAUTONEN, N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*, v. 9, p.107-116, 2010.

VARGAS-ABÚNDEZ, A. J.; RANDAZZO, B.; FODDAI, M.; SANCHINI, L.; TRUZZI, C.; GIORGINI, E.; GASCO, L.; OLIVOTTO, I. Insect meal based diets for clownfish: biometric, histological, spectroscopic, biochemical and molecular implications. *Aquaculture*, v. 498, p. 1-11, 2019.

VIEIRA, F. N.; JATOBÁ, A.; MOURINO, J.L. P. NETO, C. C. B.; SILVA, J. S.; SEIFFERT, W. Q.; SOARES, M.; VINATEA, L. A. Use of probiotic-supplemented diet on a Pacific white shrimp farm. *J. Braz. Zootec.*, v.45, p. 203-207, 2016.

VINATEA ARANA, Luis. Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura : uma revisão para peixes e camarões.. 2. ed. rev. e ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, 231p.

WANG, J.; HUANG, Y.; XU, K.; ZHANG, X.; SUN, H.; FAN, L.; YAN, M. White Spot Syndrome Virus (WSSV) infection impacts intestinal microbiota composition and function in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 84, p.130-137, 2019.

WANG, J.; WANG, X.; XU, J.; ZHAO, X.; VASTA, G. R.; WANG, J. Antimicrobial peptides by maintaining the expression. of proliferation of the hemolymph microbiota a shrimp C-type inhibits. *Journal Biol. Chem.*, v. p. 1-30, 2014.

WANG, L.; LI, F.; WANG, B.; XIANG, J. Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 33, p.1285-1291, 2012.

WANG, X.; WANG, J. Diversity and multiple functions of lectins in shrimps immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, v.39, p.27-38, 2013.

WANG, Z.; LUAN, S.; MENG, X.; CAO, B.; LUO, K.; KONG, J. Comparative transcriptomic characterization of the eyestalk in Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during ovarian maturation. *General and Comparative Endocrinology*, v.274, p.60-72, 2019.

WEI, J.; ZHANG, X.; YU, Y.; LI, F.; XIANG, J. RNA-Seq reveals the dynamic and diverse features of digestive enzymes during early development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, v. 11, p. 37-44, 2014.

XU, D.; LIU, W.; ALVAREZ, A.; HUANG, T. Cellular immune responses against viral pathogens in shrimp. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 47, p. 287-297, 2014.

XU, Z.; REGENSTEIN, J.M.; XIE, D.; LU, W.; REN, X.; YUAN, J.; MAO, L. The oxidative stress and antioxidant responses of *Litopenaeus vannamei* to low temperature and air exposure. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 72, p.564–57, 2018.

XUE, S.; YANG, W.; SUN, J. Role of chymotrypsin-like serine proteinase in white spot syndrome virus infection in *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 34, p.403-409, 2013.

ZHANG, M.; SUN, Y.; CHEN, K.; YU, N.; ZHOU, Z. ; CHEN, L.; LI, E. Characterization of the ntestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture*, v. 434, p. 449-455, 2014.

ZHAO, Q.; PAN, L.; REN, Q.; HU, D. Digital gene expression analysis in hemocytes of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to low salinity stress. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 42, p.400-407, 2015.

ZHENG, C. N.; WANG, W. Effects of *Lactobacillus pentosus* on the growth performance, digestive enzyme and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Research*, v.48, p. 2767-2777, 2017.

ZHENG, J.; CAO, J.; MAO, Y.; SU, Y.; WANG, J. Effects of thermal stress on oxidative stress and antioxidant response, heat shock proteins expression profiles and histological changes in *Marsupenaeus japonicus*. *Ecological Indicators*, v.101, p. 780-791, 2019.

ZHOU, J.; WANG, L.; XIN, Y; WANG, W.; HE, W.; WANG, A.; LIU, Y. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Thermal Biology*, v. 35, p.284-289, 2010.