

Joselle Cursino Redig

Suplementação dietética com o alcaloide isoquinolina para o camarão-branco-do-pacífico

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

Orientador: Dr. Felipe do Nascimento Vieira
Coorientadora: Dra. Norha Constanza Bolívar Ramírez

Florianópolis
2018

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

Redig, Joselle Cursino

Suplementação dietética com o alcaloide
isoquinolina para o camarão-branco-do-pacífico /
Joselle Cursino Redig ; orientador, Felipe do
Nascimento Vieira, coorientador, Norha Constanza
Bolívar Ramírez, 2018.

49 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. aditivos alimentares. 3.
desempenho zootécnico. 4. fitobiótico. I. Vieira,
Felipe do Nascimento . II. Bolívar Ramírez, Norha
Constanza . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.
IV. Título.

Suplementação dietética com o alcaloide isoquinolina para o camarão-branco-do-pacífico

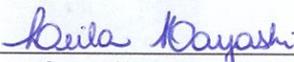
Por

JOSELLE CURSINO REDIG

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

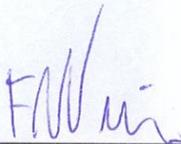
MESTRE EM AQUICULTURA

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

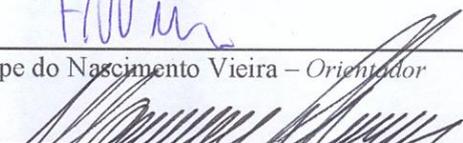


Profª. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do PPG em Aquicultura

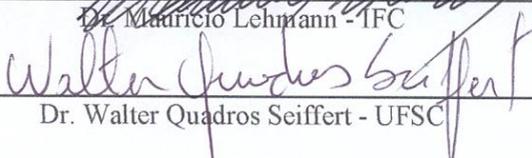
Banca Examinadora:



Dr. Felipe do Nascimento Vieira – *Orientador*



Dr. Maurício Lehmann - UFC



Dr. Walter Quadros Seiffert - UFSC

Este trabalho é dedicado ao grupo de
pesquisa do LCM da UFSC.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à Deus pelo amor e misericórdia à sua serva.

Ao orientador, Felipe do Nascimento Vieira, e à coorientadora Norha Constanza Bolívar, pelos inúmeros ensinamentos desde a época da graduação.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de camarões marinhos da UFSC, por serem uma verdadeira família que se ajuda em inúmeros experimentos seja lá de quem for.

Aos técnicos e funcionários do LCM/UFSC, pela amizade e clareza no manejo diário do camarão. Sem eles os experimentos seriam inviáveis.

Ao meu marido e companheiro, que me ajudou nos experimentos e com ideias para o trabalho escrito.

A Phytobiotics e em especial a Juliane Gaiotto pelo apoio.

A pós-graduação em Aquicultura, especialmente ao Carlito.

A todos os meus familiares, que torcem pelo meu crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES PEC-PG) pela concessão da bolsa de estudos.

Meu muito obrigada!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a suplementação dietética com alcaloide isoquinolina para o camarão-branco-do-pacífico sobre o desempenho zootécnico, microbiologia do trato intestinal, imunologia, histologia do hepatopâncreas e no desafio experimental dos camarões frente ao *Vibrio parahaemolyticus*. Os tratamentos foram inclusões de diferentes concentrações de isoquinolina (1,25; 2,5; 3,75 g.kg⁻¹) para *Litopenaeus vannamei*. As unidades experimentais foram tanques de 800L distribuídos aleatoriamente em quadruplicata, contendo 30 animais com peso médio de 3g. Após seis semanas de alimentação, observou-se uma correlação positiva do peso final, ganho de peso final, ganho de peso semanal e o fator de conversão alimentar com o aumento da concentração de isoquinolina. No final da engorda, a sobrevivência foi igual para todos os tratamentos. As análises microbiológicas do intestino para bactérias heterotróficas totais (BHT) e *Vibrio* spp. e as análises histológicas do hepatopâncreas não apresentaram diferenças entre os tratamentos. Igualmente, não houve diferenças entre os tratamentos na contagem total de hemócitos (CTH) ou no título de aglutinação da hemolinfa dos camarões. Foram encontradas diferenças apenas na atividade da fenoloxidase e na concentração proteica no tratamento isoquinolina 1,25 g kg⁻¹ quando comparado com o grupo controle. Após infecção com *Vibrio parahaemolyticus* não foram observadas diferenças nas mortalidades entre os tratamentos testados. Conclui-se que as concentrações de isoquinolina utilizadas podem melhorar os parâmetros zootécnicos na produção de *L. vannamei*, sem apresentar toxicidade. Contudo, não alteram a maioria dos parâmetros imunológicos analisados, microbiota intestinal ou resistência frente à infecção com *V. parahaemolyticus*.

Palavras Chaves: Aquicultura, aditivos alimentares, desempenho zootécnico, fitobióticos.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate dietary supplementation with isoquinoline alkaloid for Pacific white shrimp on zootechnical performance, intestinal microbiology, immunology, histology of the hepatopancreas and experimental challenge of shrimps against *Vibrio parahaemolyticus*. The treatments were inclusions of different concentrations of isoquinoline (1.25; 2.5; 3.75 g kg⁻¹) for *Litopenaeus vannamei*. The experimental units were 800 L tanks randomly distributed in quadruplicate, containing 30 animals with average weight of 3g. After six weeks of feeding, a positive correlation of final weight, final weight gain, weekly weight gain, and feed conversion factor with increasing isoquinoline concentration was observed. At the end of the experiment, survival was the same for all treatments. Microbiological analyzes of the intestine for total heterotrophic bacteria (THB) and *Vibrio* spp. and histological analyzes of the hepatopancreas showed no differences between treatments. Likewise, there were no differences between treatments in the total hemocyte count (THC) or in the titre of hemolymph agglutination of the shrimp. Differences in phenoloxidase activity and protein concentration in the isoquinoline treatment 1.25 g kg⁻¹ were found when compared to the control group. After infection with *Vibrio parahaemolyticus* no differences were observed in the mortalities between the treatments tested. It is concluded that the isoquinoline concentrations used may improve zootechnical parameters in *L. vannamei* production without toxicity. However, these concentrations do not alter the most of immunological parameters analyzed, intestinal microbiota or resistance to infection with *V. parahaemolyticus*.

Keywords: Aquaculture, feed additives, zootechnical performance, phytobiotics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Molécula de sanguinarina (AHMAD et al., 2000).....	22
Figura 2 Ganho de peso final (GPF) da engorda de <i>L. vannamei</i> alimentados com diferentes concentrações de isoquinolina na ração....	34
Figura 3 Ganho de peso total (GPT) da engorda de <i>L. vannamei</i> alimentados com diferentes concentrações de isoquinolina na ração....	34
Figura 4 Ganho de peso semanal (GPS) da engorda de <i>L. vannamei</i> alimentados com diferentes concentrações de isoquinolina na ração....	35
Figura 5 Fator de conversão alimentar (FCA) da engorda de <i>L. vannamei</i> alimentados com diferentes concentrações de isoquinolina na ração.	35
Figura 6 Fotomicrografia (20x) da seção transversal do hepatopâncreas de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentado com dieta sem adição do suplemento dietético. Células vesiculares (B), células reabsortivas (R), células embrionárias (E) e células fibrilares (F).	37
Figura 7 Fotomicrografia (20x) da seção transversal do hepatopâncreas de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentado com adição de isoquinolina nas concentrações de 1,25 g kg ⁻¹ (A); 2,5 g kg ⁻¹ (B), 3,75 g kg ⁻¹ (C) e controle (D).....	37
Figura 8 Mortalidade acumulada de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentado com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de isoquinolina após o desafio experimental com <i>Vibrio parahaemolyticus</i> na concentração de 9 x 10 ⁷ UFC mL ⁻¹	38

LISTA DE TABELA

Tabela 1 Dieta experimental utilizada na engorda de *L. vannamei*..... 29

Tabela 2 Contagem microbiológica (UFC g-1) do trato intestinal de camarões *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes concentrações de isoquinolina, semeado em Agar Marine e Agar TCBS..... 36

Tabela 3 Contagem total de hemócitos (CHT), atividade da fenoloxidase (PO), título de aglutinação (TA) e concentração proteica do soro (CP) do camarão *L. vannamei* alimentados com dieta suplementada com diferentes concentrações de isoquinolina 36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	OBJETIVOS.....	24
1.2	ESTRUTURA DO TRABALHO.....	24
2	Desenvolvimento do artigo científico: Suplementação dietética com o alcaloide isoquinolina para o camarão-branco-do-Pacífico.....	25
	RESUMO	25
	Feed supplementation with isoquinoline alkaloid for Pacific white shrimp	26
	ABSTRACT	26
	Material biológico	28
	Dieta experimental	28
	Desenho experimental	29
	Desempenho zootécnico e análises microbiológicas.....	30
	Análises imunológicas.....	30
	Contagem total de hemócitos (CTH).....	31
	Concentração de proteínas totais no soro	31
	Atividade da fenoloxidase (PO)	31
	Determinação do título aglutinante do soro	32
	Análises histológicas	32
	Desafio com <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	32
	Análises estatísticas.....	33
	RESULTADOS	33
	Parâmetros zootécnicos e microbiologia.....	33
	Parâmetros imunológicos	36
	Análises histológicas	36
	Desafio com <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	38
	DISCUSSÃO.....	38
	CONCLUSÃO	40
	AGRADECIMENTOS	41
	REFERÊNCIAS	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	45

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é um importante setor na produção mundial de alimentos. Estima-se que em 2015 foram produzidas mais de 76 milhões de toneladas de animais aquáticos, principalmente peixes, moluscos e crustáceos, gerando um comércio de quase 160 bilhões de dólares (FAO, 2018). A produção em cativeiro de organismos aquáticos tende a ganhar relevância porque, desde os anos 80, a sobre exploração pesqueira tem levado ao declínio de milhares de espécies de organismos aquáticos (WORM, 2016).

Como em todo setor produtivo, as pesquisas em produção de organismos aquáticos têm sido voltadas para maior produtividade e menor diminuição de riscos. Segundo Natale et al. (2012), os principais tópicos estudados em artigos científicos da área entre 2000 e 2012 dividem-se em três grandes áreas. A principal relaciona-se com avaliação ambiental, sistemas de produção, qualidade de água e controle do ambiente produtivo, enquanto outra se relaciona com reprodução, performance de crescimento e nutrição e outra com controle de doenças e genética.

Dentre os crustáceos, o camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) é a espécie mais produzida no Brasil e no mundo devido à sua adaptabilidade a diferentes salinidades e temperaturas de água e à sua boa taxa de crescimento e sobrevivência em ambiente de cultivo (PONCE-PALAFIX, et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2011), além de boa aceitação no mercado consumidor (ORMOND et al., 2004).

Porém, algumas doenças vêm causando riscos bastante significativos ao setor e fazem com que o seu controle seja o principal tema de pesquisas científicas envolvendo o cultivo de camarões no mundo inteiro (NATALE et al., 2012). Dentre elas, as causadas pelo gênero *Vibrio* estão entre as mais importantes no meio marinho. A necrose hepatopancreática aguda, por exemplo, causada por *Vibrio parahaemolyticus*, pode causar até 100% de mortalidade e vem pondo em risco a produção de *L. vannamei* e *Penaeus monodon* na Ásia, México e outros lugares nos últimos anos (CHONSIN et al., 2016; DE LA PEÑA et al., 2015; KONDO et al., 2014; NUNAN et al., 2014).

Controle de vibrioses na produção de camarões marinhos

As doenças em meios de cultivo são interações que dependem de um ou mais patógenos agressivos, um hospedeiro suscetível e um ambiente favorável. O controle de doenças, portanto, envolve diferentes estratégias como a diminuição do inóculo no local de cultivo, a

manipulação do local para que o patógeno não se multiplique e um incremento na resistência dos animais, que pode ser tanto através de genes específicos de resistência como através da indução da resistência inata (COCK et al., 2015).

No ambiente marinho, dificilmente pode-se evitar a entrada dos patógenos em locais de cultivo (COCK et al., 2015) e as características da água determinam a população microbiana em determinado local. Os vibrios, por exemplo, são bastante favorecidos por menores salinidades (MARTINEZ-URTAZA et al., 2008), o que é o caso de diversos cultivos situados em áreas de lagoas no sul e manguezais no nordeste do Brasil (ORMOND et al., 2004). Outros fatores que promovem a população de vibrios são altas populações de microalgas e maiores temperaturas da água (MARTINEZ-URTAZA et al., 2008). Porém, os vibrios sempre estão presentes em diferentes regiões estudadas pelo mundo como a Espanha (MARTINEZ-URTAZA et al., 2008), Estados Unidos (JHONSON et al., 2012) e Tailândia (CHONSIN et al., 2016).

A resistência genética seria a primeira opção a ser pensada. De fato, existe um grande potencial para aumentar a resistência de *L. vannamei* a diversas doenças, porém existem muitas doenças e os programas dentro de linhas específicas geralmente lidam com uma específica (CASTILLO-JUÁREZ et al., 2015). Por esta demora nos programas de melhoramento, a opção mais usual é a utilização de antibióticos nos sistemas de cultivo. Porém, a seleção faz com que surjam populações de bactérias resistentes às moléculas que são largamente utilizadas, o que faz com que a busca por novas moléculas ou métodos alternativos de controle sejam procurados constantemente (ROCHA et al., 2016; STALIN & SRINIVASAN, 2016).

Uma opção tem sido a utilização de componentes alimentares que favoreçam o crescimento de micro-organismos benéficos no trato intestinal dos animais em detrimento dos agentes patogênicos ou que aumentem a resistência dos camarões, destacando-se os probióticos e as moléculas bioativas, como os fitobióticos (COCK et al., 2015).

Uso de moléculas bioativas na carcinicultura

Moléculas bioativas são produtos do metabolismo secundário de seres vivos como micro-organismos e plantas que, quando isoladas, podem ter efeitos sobre outros organismos. A maior parte dos estudos avalia as moléculas pela ação antimicrobiana ou de cura de doenças (RODRIGUES et al., 2016), havendo também várias utilizadas como promotoras de crescimento e indutoras do apetite (CHAKRABORTHY et al., 2014).

Dentre as moléculas testadas, várias são oriundas do uso em medicina humana. Visto que o Leste e Sudeste da Ásia são os principais produtores de organismos aquáticos (FAO, 2018) e que estas regiões possuem larga tradição em medicina tradicional, diversos estudos têm sido conduzidos envolvendo a utilização de extratos vegetais utilizados milenarmente nesta região do globo, e se estendendo no mundo inteiro (CITARASU, 2010).

Como promotores do sistema imunológico, pode-se citar os polissacarídeos de raízes de ginseng (*Panax ginseng*), que quando adicionados à dieta aumentam a atividade das enzimas fosfatase ácida, fosfatase alcalina, superóxido dismutase e glutatona peroxidase nas brânquias e hepatopâncreas de *L. vannamei* (LIU et al., 2011). Outros extratos de plantas com efeitos parecidos para camarão-branco-do-pacífico são o de gengibre de Laos (*Alpinia galanga*), capaz de aumentar a resistência de *L. vannamei* frente à *Vibrio harveyi* (CHAWEEPCK et al., 2015); extrato de *Toona sinensis*, que contém rutina e confere aumento da resistência a *Vibrio alginolyticus* (HSIEH et al., 2008) e o extrato de *Uncaria tomentosa*, que aumenta a resistência ao vírus da mancha branca (WSSV; TOMAZELLI JÚNIOR et al., 2017). Algumas moléculas também estimulam o crescimento de *L. vannamei* como os manano oligossacarídeos de *Saccharomyces cerevisiae*, que conferem maior crescimento, taxa de mudas e conversão alimentar (AKTAŞ et al., 2014)

Alcalóides de isoquinolina

Uma classe de compostos bioativos que vêm recebendo especial atenção é a dos alcaloides monoamínicos da classe das isoquinolinas, que têm como esqueleto principal um anel benzênico fundido a um anel piridínico. Algumas plantas acumulam este tipo de moléculas para se defenderem de micro-organismos e herbívoros, como é o caso da berberina, da palmitina e da sanguinarina (SCHMELLER et al., 1997), que é mostrada na figura 1. Esta última tem especial destaque no uso contra cáries e placas dentárias, sendo largamente utilizada na indústria odontológica por ter efeito antimicrobiano de largo espectro afetando fungos, bactérias e vírus (GODOWSKI, 1989).

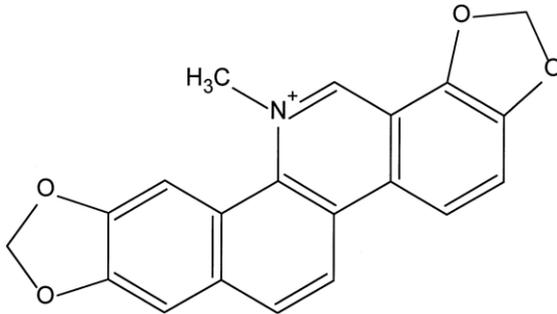


Figura 1 Molécula de sanguinarina (AHMAD et al., 2000)

A sanguinarina é obtida tradicionalmente dos rizomas de *Sanguinaria canadensis*, uma planta medicinal utilizada por povos indígenas norte americanos para curar diversos quadros clínicos e que comprovadamente possui ação inibitória contra o câncer (CROAKER et al., 2016). Está presente também em menor quantidade em outras plantas como *Argemone mexicana*, *Chelidonium majus* e *Macleaya cordata*, sendo purificada por extração alcóolica. Existem também pesquisas envolvendo a produção a partir de suspensões celulares *in vitro* de *Papaver somniferum* (VERMA et al., 2014) e *Eschscholzia californica* (YAMADA et al., 2015), o que viabilizaria ainda mais a produção e utilização em larga escala desta molécula.

Uso de isoquinolinas na alimentação animal

Na alimentação animal, as isoquinolinas tem sido utilizadas como aditivo fitogênico em extrato de *Macleaya cordata* com concentração mínima de 1,5% (ZAO et al., 2017; ZDARILOVA et al., 2008). Em frangos de corte, existem relatos de incrementos de parâmetros zootécnicos, melhorias na qualidade de carcaça e efeito protetivo contra doenças, possivelmente relacionados com aumentos em populações de bactérias benéficas no trato intestinal. Lee et al. (2015), por exemplo, relataram que a adição de isoquinolina em doses de 0,02 e 0,05 g kg⁻¹ durante cinco dias na alimentação pode proporcionar incremento de 11,5% no ganho de peso, além de maior consumo de ração e melhor taxa de conversão alimentar. Eles também relataram aumento na população de bactérias ácido lácticas do intestino e menores teores de colesterol e malondialdeído nos músculos das coxas dos frangos. Vieira et al. (2008) também relataram um incremento no ganho de peso em frangos de corte, aos 42 dias, porém de apenas 1,3% sem incrementos no consumo de ração, apenas no fator de conversão alimentar. Quando infectados com

Salmonella thyphimurium, Abudabos et al. (2016) demonstraram que frangos de corte que consumiram rações com 5 g kg^{-1} de uma marca comercial de isoquinolina obtiveram o mesmo ganho de peso que frangos de corte não inoculados, provando que este composto confere um efeito protetivo.

Em porcos, um estudo conduzido por Kantas et al. (2015) mostrou que a adição de $0,05\text{ g kg}^{-1}$ de isoquinolina em rações de leitões durante seis semanas aumentou o ganho de peso em 2,5% e diminuiu o fator de conversão alimentar em 1,7%. Isto pode estar relacionado ao efeito antibiótico sobre microrganismos no trato intestinal, o que é evidenciado por estudos que apontam uma diminuição na fermentação no ceco (PELLIKAAN et al., 2010) e no escore de diarreia (LIU et al., 2016), que é relacionado a organismos patogênicos. No sangue, Gudev et al. (2004) relataram um declínio no teor de colesterol e um aumento significativo na concentração de lisozima do *serum* e um maior índice de fagocitose em animais que receberam $0,03\text{ g kg}^{-1}$ na dieta, o que indica um incremento na atividade imunológica nos animais em crescimento. Segundo Zhao et al. (2017), doses até 1 g kg^{-1} na ração por 90 dias não apresentaram efeitos tóxicos para estes animais, porém não testaram dosagens maiores.

Quanto à segurança alimentar do uso de isoquinolina como aditivo, um estudo de 90 dias em ratos mostrou efeitos tóxicos apenas a partir da concentração de 14 g.kg^{-1} na dieta relacionados com aumentos nos níveis de glutatona reduzida e atividade da enzima superóxido dismutase no fígado dos animais (ZDARILOVA et al., 2008). Em relação aos resíduos na carcaça, Long et al. (2015) demonstraram que patos, frangos e porcos alimentados com concentrações até $0,08\text{ g kg}^{-1}$ acumulam quantidades menores que 5mg.g^{-1} de isoquinolina nos fígados, rins e músculos, sendo uma concentração bastante segura segundo eles.

A maior parte dos estudos está relacionada com a adição em dietas de frangos de corte e porcos, porém alguns trabalhos têm sido feitos também na área de aquicultura. Como exemplo, Rawling et al. (2009) obtiveram ganhos de peso 36% maiores em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas por 10 semanas com dietas com adições entre $0,025$ e $0,1\text{ g.kg}^{-1}$ de isoquinolina em relação ao controle. Eles também obtiveram um incremento de 2,76 vezes mais glóbulos brancos no tratamento contendo $0,05\text{ g kg}^{-1}$, o que é bastante relevante quanto ao estado imunológico dos animais. Outro peixe cujos efeitos benéficos deste produto já foram comprovados na engorda foi *Rutilus rutilus*, em que se conseguiu incrementos de até 72% em experimento de engorda por 45 dias quando adicionado em proporções entre $0,5$ e $1,5\text{ g.kg}^{-1}$ na alimentação e níveis menores de glicose e colesterol no sangue

indicando maior tolerância ao estresse (IMANPOOR & ROOHI, 2016). Quanto à produção de alevinos, Imanpoor et al. (2015) encontraram efeitos positivos com a adição entre 0,5 e 1,5 g kg⁻¹ de isoquinolinas na alimentação de carpa comum (*Cyprinus carpio*) envolvendo níveis mais baixos de colesterol e glicose e maiores concentração de proteína total no sangue.

No caso de camarões, Rairat et al. (2013) não detectaram incrementos em parâmetros zootécnicos em concentrações na dieta de 0,1 e 0,2 g kg⁻¹, porém encontraram efeitos positivos de incremento na atividade anti-inflamatória no hepatopâncreas e diminuição na concentração de *V. harveyi* nos intestinos dos animais.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste estudo é avaliar o uso de suplementação dietética com alcaloide isoquinolina no cultivo de *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos Específicos

- a) Analisar o efeito de suplementação dietética com alcaloide isoquinolina sobre o desempenho zootécnico de *L. vannamei* no cultivo em água clara;
- b) Analisar o efeito de suplementação dietética com alcaloide isoquinolina na microbiota intestinal de *L. vannamei*;
- c) Analisar o efeito de suplementação dietética com alcaloide isoquinolina sobre a atividade imunológica de *L. vannamei*;
- d) Analisar o efeito de suplementação dietética com alcaloide isoquinolina sobre a histologia do hepatopâncreas de *L. vannamei*;
- e) Determinar a sobrevivência de camarões *L. vannamei* alimentados com suplementação dietética com alcaloide isoquinolina e desafiados com *V. parahaemolyticus*.

1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

O artigo desta dissertação está formatado nas normas do Boletim do Instituto de Pesca, Qualis B1 da CAPES.

2 Desenvolvimento do artigo científico: Suplementação dietética com o alcaloide isoquinolina para o camarão-branco-do-Pacífico

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a suplementação dietética com alcaloide isoquinolina para o camarão-branco-do-pacífico sobre o desempenho zootécnico, microbiologia do trato intestinal, imunologia, histologia do hepatopâncreas e no desafio experimental dos camarões frente ao *Vibrio parahaemolyticus*. Os tratamentos foram inclusões de diferentes concentrações de isoquinolina (1,25; 2,5; 3,75 g kg⁻¹) para *Litopenaeus vannamei*. As unidades experimentais foram tanques de 800L distribuídos aleatoriamente em quadruplicata, contendo 30 animais com peso médio de 3g. Após seis semanas de alimentação, observou-se uma correlação positiva do peso final, ganho de peso final, ganho de peso semanal e o fator de conversão alimentar com o aumento da concentração de isoquinolina. No final da engorda, a sobrevivência foi igual para todos os tratamentos. As análises microbiológicas do intestino para bactérias heterotróficas totais (BHT) e *Vibrios* spp. e as análises histológicas do hepatopâncreas não apresentaram diferenças entre os tratamentos. Igualmente, não houve diferenças entre os tratamentos na contagem total de hemócitos (CTH) ou no título de aglutinação da hemolinfa dos camarões. Foram encontradas diferenças apenas na atividade da fenoloxidase e na concentração proteica no tratamento isoquinolina 1,25 g kg⁻¹ quando comparado com o grupo controle. Após infecção com *Vibrio parahaemolyticus* não foram observadas diferenças nas mortalidades entre os tratamentos testados. Conclui-se que as concentrações de isoquinolina utilizadas podem melhorar os parâmetros zootécnicos na produção de *L. vannamei*, sem apresentar toxicidade. Contudo, não alteram a maioria dos parâmetros imunológicos analisados, microbiota intestinal ou resistência frente à infecção com *V. parahaemolyticus*.

Palavras Chaves: Aditivos alimentares, Desempenho zootécnico, *Vibrio*, Fitobióticos, Sanguinarina.

Feed supplementation with isoquinoline alkaloid for Pacific white shrimp

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate dietary supplementation with isoquinoline alkaloid for Pacific white shrimp on zootechnical performance, intestinal microbiology, immunology, histology of the hepatopancreas and experimental challenge of shrimps against *Vibrio parahaemolyticus*. The treatments were inclusions of different concentrations of isoquinoline (1,25; 2,5; 3,75 g.kg⁻¹) for *Litopenaeus vannamei*. The experimental units were 800L tanks randomly distributed in quadruplicate, containing 30 animals with average weight of 3g. After six weeks of feeding, a positive correlation of final weight, final weight gain, weekly weight gain, and feed conversion factor with increasing isoquinoline concentration was observed. At the end of the experiment, survival was the same for all treatments. Microbiological analyzes of the intestine for total heterotrophic bacteria (THB) and *Vibrio* spp. and histological analyzes of the hepatopancreas showed no differences between treatments. Likewise, there were no differences between treatments in the total hemocyte count (THC) or in the titre of hemolymph agglutination of the shrimp. Differences in phenoloxidase activity and protein concentration in the isoquinoline treatment 1.25 g kg⁻¹ were found when compared to the control group. After infection with *Vibrio parahaemolyticus* no differences were observed in the mortalities between the treatments tested. It is concluded that the isoquinoline concentrations used may improve zootechnical parameters in *L. vannamei* production without toxicity. However, these concentrations don't alter the most of immunological parameters analyzed, intestinal microbiota or resistance to infection with *V. parahaemolyticus*.

Keywords: Food additives, Zootechnical performance, *Vibrio*, probiotics, Sanguinarine.

INTRODUÇÃO

A aquicultura é um importante setor na produção mundial de alimentos. Estima-se que, em 2014, foram produzidas mais de 71 milhões de toneladas de animais aquáticos, gerando um comércio de mais de 160 milhões de dólares. Os principais organismos são peixes, moluscos e crustáceos (FAOSTAT, 2016). Dentre os crustáceos, o camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) é a espécie mais produzida no Brasil e no mundo e algumas doenças vêm causando riscos significativos ao setor. Dentre elas, as causadas pelo gênero *Vibrio* estão entre as mais importantes no meio marinho. A necrose hepatopancreática aguda, por exemplo, causada por *Vibrio parahaemolyticus*, pode causar até 100% de mortalidade. Esta doença vem pondo em risco a produção de *L. vannamei* e *Penaeus monodon* na Ásia, México e outros lugares nos últimos anos (KONDO *et al.*, 2014; NUNAN *et al.*, 2014).

A principal forma de controle de bacterioses na aquicultura é a utilização de antibióticos. Porém, são comuns os casos de resistência bacteriana a estas moléculas, aumentando a demanda por formas alternativas (ROCHA *et al.*, 2016; STALIN e SRINIVASAN, 2016). Dentre os métodos estudados, vem se destacando a utilização de aditivos alimentares que contribuem não apenas para a diminuição do efeito das doenças, mas também como promotores de crescimento. Entre as soluções estudadas estão os fitobióticos, que são moléculas do metabolismo secundário de plantas com diversos efeitos sobre os microorganismos e os animais.

A isoquinolina é um alcaloide que tem sido utilizado como aditivo alimentar em produções zootécnicas através de um extrato da planta *Macleaya cordata*. Os estudos apontam melhorias no desempenho zootécnico e na resistência a doenças de frangos de corte (KARIMI *et al.*, 2014) e de porcos (GUDEV *et al.*, 2004). Sendo pouco solúvel em água, existe um grande potencial para o seu uso em aquicultura, melhorando a eficiência alimentar, o ganho de peso e aspectos imunológicos de *Rutilus caspicus* (IMANPOOR e ROOHI, 2016) e o ganho de peso em *Oreochromis niloticus* (RAWLING *et al.*, 2009).

O presente estudo visa determinar o efeito de isoquinolina como aditivo alimentar no cultivo de *L. vannamei* avaliando desempenho zootécnico, microbiota intestinal, atividade imunológica e histologia do hepatopâncreas dos animais e sua resistência frente a *V. parahaemolyticus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado em Florianópolis, SC.

Material biológico

Foram utilizados camarões *L. vannamei* com peso inicial de 3 g high health SPEEDLINE HB12. Os náuplios foram obtidos na Aquatec Aquacultura LTDA, localizada no Rio Grande do Norte, e foram cultivados no LCM até o início do experimento.

Dieta experimental

As dietas foram formuladas de acordo com os requerimentos nutricionais dos camarões (NRC – *Nutrient requirements of fish and shrimp*) e foram avaliadas três dietas suplementadas com isoquinolina (1,25; 2,5; 3,75 g kg⁻¹) e controle sem suplementação.

Tabela 1 Dieta experimental utilizada na engorda de *L. vannamei*

Ingredientes	g kg⁻¹
Farinha de resíduo de salmão	31,20
Farelo de soja	18,13
Farinha de trigo	12,41
Quirera de arroz	20,22
Óleo de fígado de bacalhau	3,27
Premix vitamínico	0,38
Vitamina C	0,07
Premix macromineral	6,62
Premix micromineral	1,62
Lecitina	2,05
CMC	2,00
Caulim	2,03
Composição centesimal	%
Proteína bruta	36,38
Umidade	10,90
Extrato etéreo	9,72
Fibra bruta	1,46
Matéria mineral	14,58
Energia bruta (kcal/kg)	4114,61

Desenho experimental

Os tratamentos contendo isoquinolina (1,25; 2,5; 3,75 g kg⁻¹) e o controle foram distribuídos aleatoriamente em quadruplicada, na sala experimental da estufa do laboratório de camarões marinhos totalizando 16 unidades experimentais. Foram utilizados tanques de 800L de capacidade útil em sistema de cultivo em água clara, com 80% de renovação de água por dia, equipados com aquecedores (temperatura da água mantida em 28±1°C) e sistema de aeração (O₂> 5 mg L⁻¹). O experimento teve duração de seis semanas, e cada tanque foi povoado com 30 camarões. A alimentação diária foi equivalente a 3% da biomassa dividida quatro vezes ao dia (8:00, 12:00, 14:00 e 17:00h), sendo o consumo verificado após 1:30h para regular o fornecimento de ração. Durante o experimento, foram monitorados o oxigênio dissolvido e temperatura duas vezes por dia. Amônia, nitrito, nitrato, pH e salinidade foram monitorados uma vez por semana. Semanalmente, foram coletados

10 animais por tanque para estimar a média do ganho de peso semanal, e para reajustar a próxima alimentação.

Desempenho zootécnico e análises microbiológicas

Após o período de seis semanas do ensaio de engorda em água clara, os seguintes índices zootécnicos foram avaliados: ganho em peso total (g), ganho em peso semanal (g), ganho em peso final (g), sobrevivência (%) e fator de conversão alimentar (FCA).

Adicionalmente, cinco camarões por tanque foram amostrados para realização de análise microbiológica do trato intestinal. Estes foram homogeneizados em um gral e diluídos em 10 vezes em solução salina estéril (SSE) a 3% e espalhados em placas de petri contendo os meios Agar Marinho, para seleção de bactérias heterotróficas, e Agar Citrato Bile Sacarose (TCBS), para bactérias vibrionáceas. Após 24h de incubação a 30°C, foram contabilizados os números de unidades formadoras de colônia (UFC) em ambos os meios.

Análises imunológicas

Para as análises imunológicas cinco camarões por tanque foram amostrados para a contagem total de hemócitos, atividade da enzima fenoloxidase, concentração proteica do soro e atividade aglutinante do soro.

Para a obtenção de soro, a hemolinfa dos camarões de cada tratamento (n=5 para cada unidade experimental) foram coletadas através de uma seringa (1 ml) com agulha (13x0,4 mm), inserida na região ventral do primeiro segmento abdominal dos camarões. Foi feito 1 *pool* de 5 animais por unidade experimental. Para a preparação do soro, a hemolinfa coletada foi deixada coagular por 2 h a temperatura ambiente. O coágulo formado foi quebrado com o auxílio de um bastão de vidro e repetidamente centrifugado a 6.000×g por 10 min a 4°C. O sobrenadante correspondente ao soro (contendo fatores plasmáticos e celulares) foi removido e congelado a -20°C para uso posterior nos ensaios de concentração proteica, atividade da fenoloxidase e atividade aglutinante do soro.

Contagem total de hemócitos (CTH)

A contagem total de hemócitos (CTH) foi estimada em câmara de Neubauer. Para tal, as hemolinfas dos animais (1 *pool* de 5 animais por unidade experimental) foram coletadas em solução fixadora constituída de 4% de formaldeído em solução anticoagulante MAS (Solução de Alsever Modificada) (336 mM NaCl, 115 mM glicose, 27 mM citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2) a uma diluição conhecida.

Concentração de proteínas totais no soro

A concentrações proteicas do soro (1 *pool* de 5 animais por grupo) foram determinadas segundo o método de BRADFORD (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão. Para tal, 20 µl de soro (diluído 4000x em água milliQ) foi depositado em poços de uma microplaca (fundo chato) e acrescidos de 200 µl de solução de Bradford. A mistura foi então incubada por 15 min, a temperatura ambiente e a CP determinada após mensurar a absorbância (595 nm), em leitor de microplacas. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Atividade da fenoloxidase (PO)

A determinação da atividade da PO nas amostras de soro foram realizadas colorimetricamente, através da formação do pigmento vermelho coral DOPA-cromo, proveniente da oxidação do substrato enzimático L-DOPA pela PO do soro. Amostras de 50 µl do soro previamente diluído (16 x) em TBS (50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, pH 7,4), foram pré-incubadas com um volume igual de tripsina (SIGMA) (1mg.mL⁻¹), indutor da atividade enzimática, durante 5 min a temperatura ambiente, em uma microplaca de 96 poços de fundo chato. Nos controles, o indutor ou o soro forma substituídos por um volume equivalente de TBS. Em seguida, os poços receberam 50 µl de L-DOPA (3mg.mL⁻¹) e a formação do pigmento DOPA-cromo quantificado em leitor de microplacas (Tecan, Barueri, SP) na absorbância de 490 nm, após 5, 10, 15 e 20 min. A atividade enzimática da PO foram expressa pela variação da absorbância por minuto e por miligrama de proteínas, onde uma unidade da atividade enzimática correspondeu ao aumento de 0,001 na absorbância, por min e por miligrama de proteína a 20°C (SÖDERHÄLL e HÄLL, 1984). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Determinação do título aglutinante do soro

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

Análises histológicas

Ao final do experimento, dois camarões por tanque foram amostrados para realização de análises histológicas do hepatopâncreas. Sendo assim, 32 animais foram coletados formando 16 *pools*, sendo quatro *pools* por tratamento. Os hepatopâncreas foram seccionados com auxílio de navalha, fixadas em solução padrão de Davidson marinho por 24h e, na sequência, transferidos para a solução de álcool 70%. Em seguida, as amostras foram submetidas ao procedimento padrão de histologia com desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos confeccionados foram cortados em Micrótomo com 5 µm de espessura para posterior coloração com hematoxilina de Harris e Eosina e observadas em microscópio modelo Zeiss Axiostar Plus.

Desafio com *Vibrio parahaemolyticus*

Para realização do desafio experimental, 10 camarões por unidade experimental (160 animais) foram desafiados com o *V. parahaemolyticus*. Cada camarão foi injetado com 100µL de *V. parahaemolyticus* em uma concentração de 9×10^7 UFC mL⁻¹ segundo o teste de Dose Letal (DL50) realizada previamente. Como controle um grupo com 20 camarões foram injetados com 100 µL de solução salina estéril (SSE). Após 48h de observação a sobrevivência dos camarões foi avaliada.

Análises estatísticas

Para as análises microbiológicas, imunológicas e do desafio com *V. parahaemolyticus*, foram avaliadas as premissas de normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene dos dados brutos. Posteriormente, foram feitas análises de variância e, no caso de diferenças significativas, aplicado o teste de Tukey de separação de médias (ZAR, 2009). No caso dos parâmetros zootécnicos, foram realizadas análises de regressão via modelos lineares e realizada análise de variância. Para todos os testes foi utilizado como limite de significância a probabilidade de erro tipo 1 (valor p) igual a 5%.

RESULTADOS

Parâmetros zootécnicos e microbiologia

O peso final (figura 2), ganho de peso total (figura 3), ganho de peso semanal (figura 4) e o fator de conversão alimentar (figura 5) mostraram uma correlação positiva com o aumento da concentração de isoquinolina. No final da engorda, a sobrevivência foi igual para todos os tratamentos.

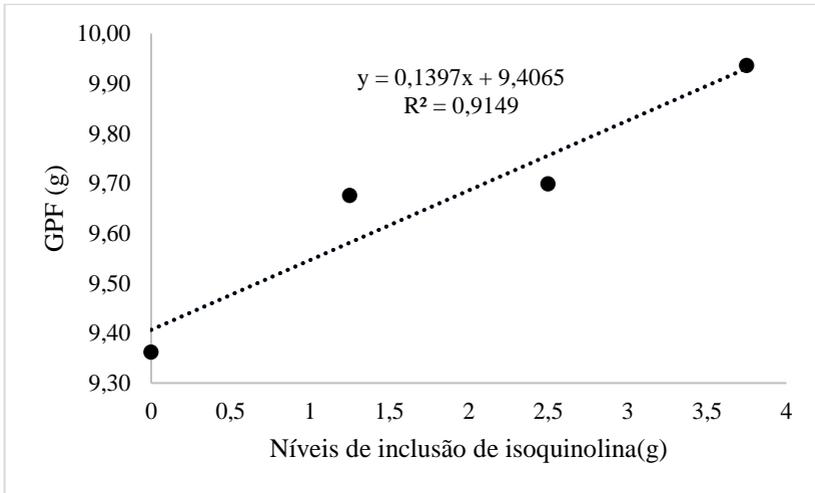


Figura 2 Ganho de peso final (GPF) da engorda de *L. vannamei* alimentados com diferentes concentrações de isoquinolina na ração.

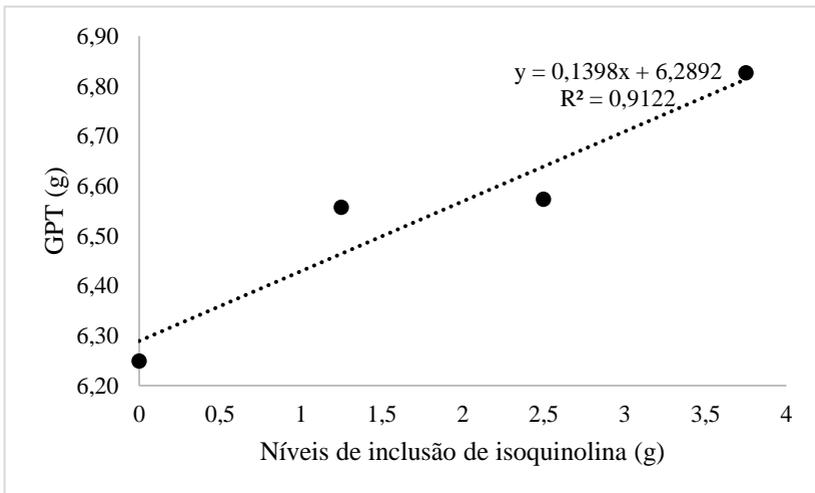


Figura 3 Ganho de peso total (GPT) da engorda de *L. vannamei* alimentados com diferentes concentrações de isoquinolina na ração.

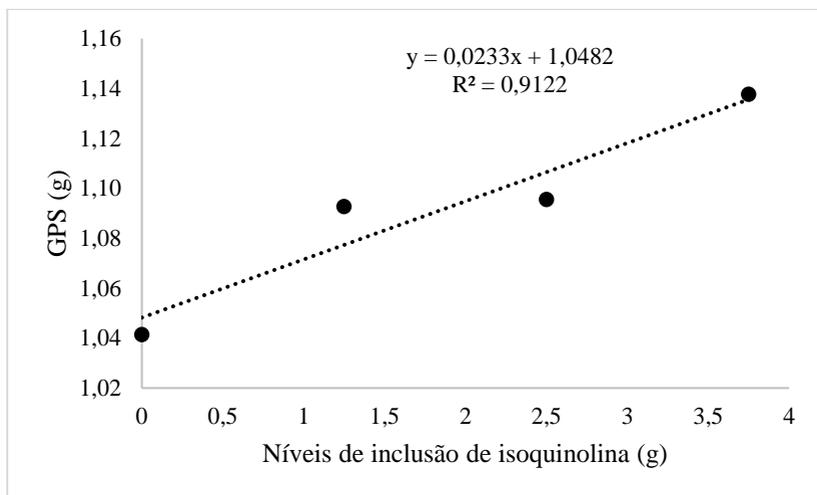


Figura 4 Ganho de peso semanal (GPS) da engorda de *L. vannamei* alimentados com diferentes concentrações de isoquinolina na ração.

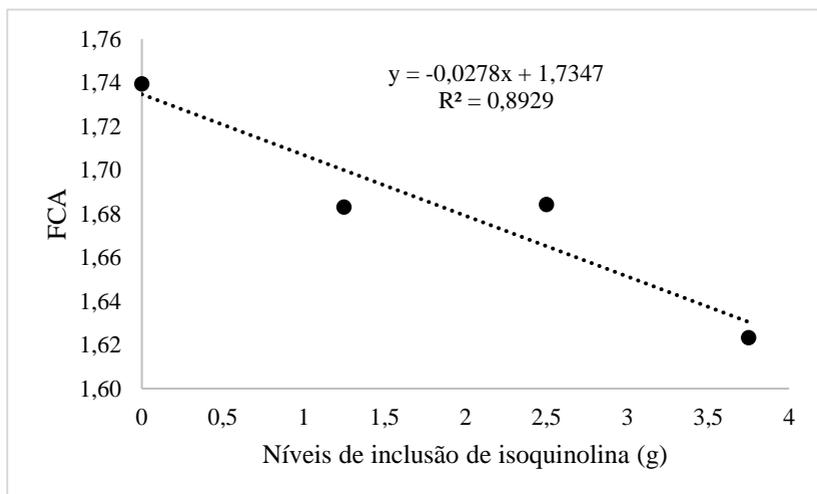


Figura 5 Fator de conversão alimentar (FCA) da engorda de *L. vannamei* alimentados com diferentes concentrações de isoquinolina na ração.

Nas análises microbiológicas do trato intestinal não foram encontradas diferenças nas contagens de bactérias heterotróficas totais e *Vibrios* spp. (Tabela 2).

Tabela 2 Contagem microbiológica (UFC g⁻¹) do trato intestinal de camarões *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes concentrações de isoquinolina, semeado em Agar Marine e Agar TCBS.

Concentração	Marine	TCBS
1,25 g.kg ⁻¹	1,55 x 10 ⁹	6,37 x 10 ⁷
2,5 g.kg ⁻¹	5,52 x 10 ⁸	3,76 x 10 ⁷
3,75 g.kg ⁻¹	4,86 x 10 ⁸	1,45 x 10 ⁷
Controle	3,33 x 10 ⁸	1,68 x 10 ⁷

Parâmetros imunológicos

Ao final do experimento de engorda, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos testados e o controle quanto à contagem total de hemócitos e título de aglutinação na hemolinfa dos camarões. Foram encontradas diferenças apenas na atividade de fenoloxidase e na concentração proteica, que foram inferiores ao controle quando adicionado o extrato na concentração de 1,25 g kg⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3 Contagem total de hemócitos (CHT), atividade da fenoloxidase (PO), título de aglutinação (TA) e concentração proteica do soro (CP) do camarão *L. vannamei* alimentados com dieta suplementada com diferentes concentrações de isoquinolina

	Concentrações de Isoquinolina			Controle
	1,25 g kg ⁻¹	2,5 g kg ⁻¹	3,75 g kg ⁻¹	
CHT	29,6±6,8 ^a	26,3±3,5 ^a	43,1±1,6 ^a	37,7±1,3 ^a
PO	20,6±5,9 ^a	25,1±5,8 ^{ab}	28,6±6,7 ^{ab}	32,0±6,0 ^b
TA	10,5±0,6 ^a	11,0±0,0 ^a	11,0±0,0 ^a	11,0±0,0 ^a
CP	417,1±119,3 ^a	502,2±116,8 ^{ab}	571,4±133,5 ^{ab}	639,4±119,1 ^b

Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CHT: Contagem total de hemócitos (x10⁶ mL⁻¹); PO: atividade da fenoloxidase (min⁻¹.mg⁻¹ de proteína); TA: título de aglutinação (Log₂ x+1); CP: Concentração proteica (mg.mL⁻¹).

Análises histológicas

Não foram observadas diferenças qualitativas nas análises histológicas feitas com os hepatopâncreas dos animais dos diferentes tratamentos ao final do experimento. Em todas as lâminas observou-se

tecidos íntegros e foram reconhecidas as células embrionárias, fibrilares, reabsortivas e vesiculares (figuras 6 e 7).

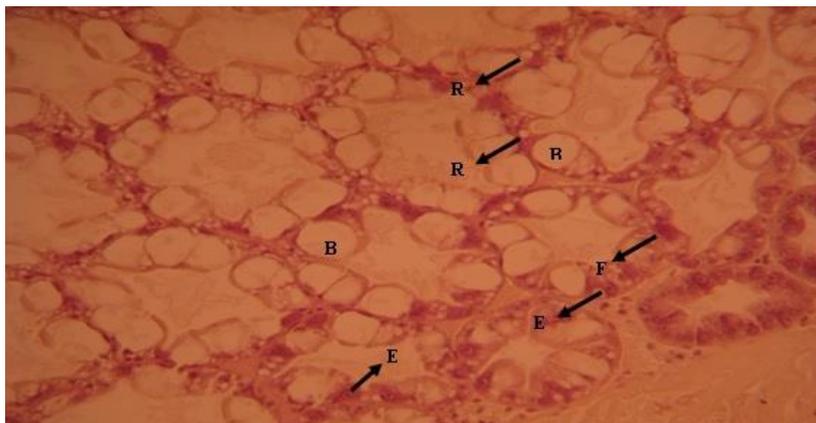


Figura 6 Fotomicrografia (20x) da seção transversal do hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentado com dieta sem adição do suplemento dietético. Células vesiculares (B), células reabsortivas (R), células embrionárias (E) e células fibrilares (F).

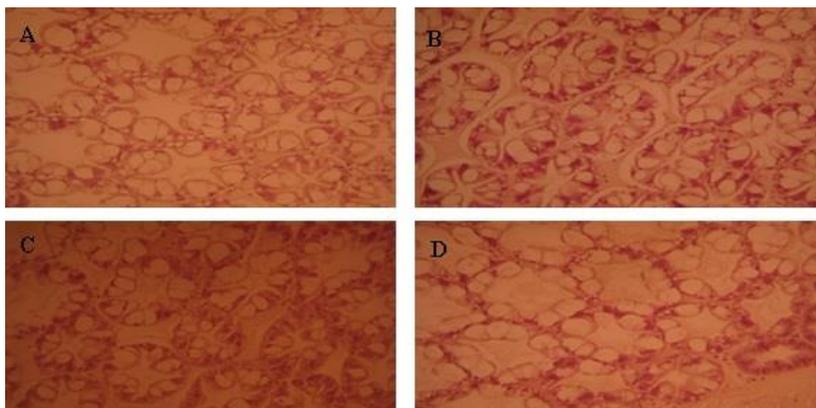


Figura 7 Fotomicrografia (20x) da seção transversal do hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* alimentado com adição de isoquinolina nas concentrações de 1,25 g kg⁻¹ (A); 2,5 g kg⁻¹ (B), 3,75 g kg⁻¹ (C) e controle (D).

Desafio com *Vibrio parahaemolyticus*

Os resultados não apontaram diferenças nas mortalidades após infecção com o patógeno (figura 8). Contudo, o tratamento com o menor nível de inclusão ($1,25 \text{ g kg}^{-1}$) foi o único tratamento que obteve 100% de mortalidade após 36 horas. O tratamento com $2,5 \text{ g kg}^{-1}$ de isoquinolina e o grupo controle apresentaram mortalidades de 77,5% e 72,5% respectivamente no final da infecção. Já os camarões alimentados com nível de inclusão de $3,75 \text{ g kg}^{-1}$ tiveram as menores mortalidades após 72 horas de desafio experimental com *V. parahaemolyticus*. Porém, não foram encontradas diferenças estatísticas.

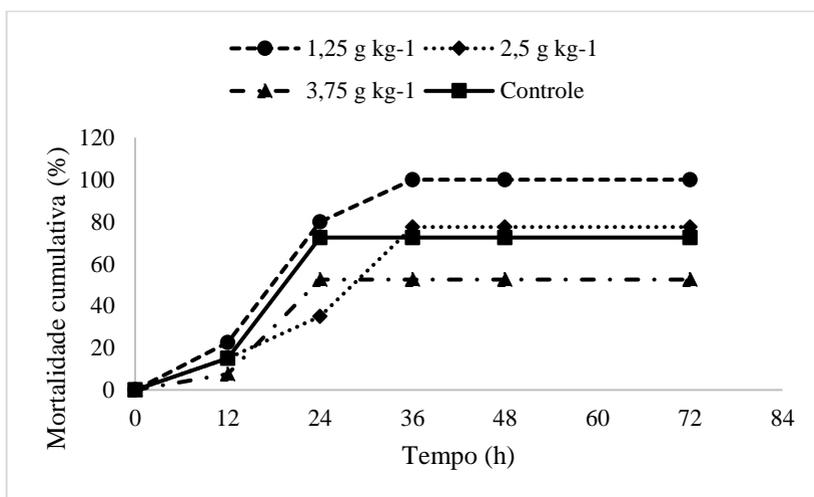


Figura 8 Mortalidade acumulada de *Litopenaeus vannamei* alimentado com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de isoquinolina após o desafio experimental com *Vibrio parahaemolyticus* na concentração de $9 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$.

DISCUSSÃO

Assim como neste, vários estudos têm demonstrado que o uso de isoquinolinas como aditivos alimentares possui efeito positivo na alimentação. Destacam-se pesquisas com porcos e frangos, com relatos de aumento de ganho de peso, eficiência alimentar e sobrevivência (VIEIRA *et al.*, 2008; GUDEV *et al.*, 2004; KARIMI *et al.*, 2014). Igualmente, alguns estudos demonstraram que a adição de isoquinolina

na dieta aumentou o ganho de peso, taxa de crescimento específico e eficiência alimentar em peixes como o *Rutilus rutilus* e *Dicentrarchus labrax* (IMANPOOR e ROOHI, 2016; KORKUT *et al.*, 2012). O uso deste extrato em tilápia-do-Nilo também teve um efeito positivo na ingestão alimentar incrementando seu ganho de peso sugerindo que o aditivo melhorou o apetite dos peixes (RAWLING *et al.*, 2009).

Sabe-se que as isoquinolinas possuem efeito antimicrobiano de largo espectro inibindo diversas espécies de bactérias incluindo: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *V. harveyi* e *Vibrio anguillarum* (KOSINA *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2012; GODOWSKI, 1989). No entanto, não houve alteração nas concentrações de bactérias heterotróficas totais ou vibrios no intestino dos camarões alimentados com diferentes concentrações de isoquinolina. Em contraste, outros estudos evidenciaram uma diminuição nas concentrações de *Vibrio harveyi* no intestino de *L. vannamei* alimentados com isoquinolinas na dieta.

As semelhanças entre as histologias dos hepatopâncreas dos animais alimentados ou não com isoquinolina sugerem que não há efeitos colaterais sobre os camarões alimentados com as doses testadas. Uma das desvantagens de trabalhar com extratos de plantas é a possibilidade de danos aos tecidos por possuírem certa toxicidade (GHUGHUSKAR, 2016). Estes efeitos foram bastante visíveis em outros trabalhos onde camarões alimentados com dietas contendo toxinas vegetais apresentaram necrose nas células epiteliais tubulares (BAUTISTA *et al.*, 1994; BOONYARATPALIN *et al.*, 2001). Um estudo de 90 dias em ratos mostrou efeitos tóxicos apenas a partir da concentração de 14 g kg⁻¹ na dieta, evidenciados por aumentos nos níveis de glutathione reduzida e atividade da enzima superóxido dismutase no fígado dos animais (ZDARILOVA *et al.*, 2008).

Em relação aos resíduos na carcaça, Long *et al.* (2015) demonstraram que patos, frangos e porcos alimentados com concentrações até 0,08 g kg⁻¹ acumulam quantidades menores que 5mg g⁻¹ de isoquinolina nos fígados, rins e músculos, o que é uma concentração bastante segura segundo estes autores. Porém, não foram encontrados estudos sobre resíduos em carcaça de organismos aquáticos, o que precisaria ser investigado.

Autores relatam que as isoquinolinas também podem ter um efeito imunomodulador nos organismos (CHATURVEDI *et al.*, 1997). No caso de porcos, foi observado um aumento na atividade da lisozima do soro e na atividade fagocítica tanto na fase de recria como de engorda (GUDEV

et al. 2004). Já em peixes, o uso de isoquinolina na dieta de *R. rutilus* aumentou a concentração da proteína total do soro, um importante parâmetro do sistema imune não específico. Em tilápia, RAWLING *et al.*, (2009) encontraram maiores níveis de leucócitos nos grupos de animais alimentados com isoquinolina, contudo sem diferenças em outros parâmetros imunológicos como atividade da lisozima, glicose do soro e contagens de eritrócitos. No entanto, no presente estudo não foram encontradas diferenças satisfatórias entre os tratamentos pois não alterou a contagem total de hemócitos e título de aglutinação, apenas a atividade da fenoloxidase e a concentração proteica do soro da hemolinfa na concentração de 1,25 g Kg⁻¹ quando comparada com grupo controle.

A imunologia dos organismos tende a estar relacionada com sua resistência a infecções. Por esse motivo, os ensaios de resistência do hospedeiro frente a infecções são considerados os testes definitivos para determinar a função do sistema imune, pois medem uma resposta integrada em todo o nível do organismo. Alguns trabalhos em aquicultura demonstraram que o uso de isoquinolina (sanguinarina) aumenta a resistência de animais à bactéria *A. hydrophila*. Ling *et al.* (2016) demonstraram que a injeção de diferentes doses em carpa comum, por exemplo, diminui a mortalidade dos animais quando expostos a este patógeno. Já os peixes *Carassius auratus* tiveram menor carga bacteriana nos tecidos (ZHANG *et al.*, 2013). Contudo, trabalhos utilizando isoquinolinas para determinar a resistência a patógenos tanto em peixes como em camarões ainda são reduzidos ou nulos na aquicultura. Mais ensaios são necessários para determinar e comparar os efeitos *in vivo* frente a desafios bacterianos em animais aquáticos.

CONCLUSÃO

A suplementação dietética com isoquinolina entre 1,25 e 3,75 g Kg⁻¹ tem efeito positivo no desempenho zootécnico do camarão, incrementando o crescimento e baixando a conversão alimentar, e não apresenta efeitos tóxicos aos tecidos do hepatopâncreas. Porém, as doses ministradas não promovem um efeito protetor a doenças, já que não incrementaram a sobrevivência na infecção com *V. parahaemolyticus*, não alteraram as populações de vibrios e bactérias heterotróficas totais no trato intestinal. Também não alteram a contagem total de hemócitos e título de aglutinação, tendo apenas alterado a atividade da fenoloxidase e a concentração proteica do soro da hemolinfa na concentração de 1,25 g Kg⁻¹.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da empresa Phytobiotics e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES PEC-PG) pela bolsa concedida a autora. Felipe Vieira é bolsista de produtividade do CNPq (protocolo nº PQ 305357/2017-4).

REFERÊNCIAS

BAUTISTA, M.N.; LAVILLA-PITOGO, C.R.; SUBOSA, P.F.; BEGINO, E.T. 1994 Aflatoxin B1 contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of pre-adult *Penaeus monodon*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65(1): 5-11.

BOONYARATPALIN, M.; SUPAMATTAYA, K.; VERAKUNPIRIYA, V.; SUPRASERT, D. 2001 Effects of aflatoxin B1 on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Aquaculture Research*, 32(1): 388-398.

BRADFORD, M. M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72(1-2); 248-254.

CHATURVEDI, M.M.; KUMAR, A.; DARNAY, B.G.; CHAINY, G.B.; AGARWAL, S.; AGGARWAL, B.B. 1997 Sanguinarine (pseudocheleerythrine) is a potent inhibitor of NF- κ B activation, I κ B α phosphorylation, and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(48): 30129-30134.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). *An Overview of Recently Published Global Aquaculture Statistics*. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-bs235e.pdf>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2018.

GHUGHUSKAR, M.M. 2016 Emerging Role of Medicinal Plants and Herbs in Combating the Diseases in Aquatic Environmental Animals. *Advances in Life Sciences*, 5(7): 2559-2566.

GODOWSKI, K.C. 1989 Antimicrobial action of sanguinarine. *The Journal of clinical dentistry*, 1(4): 96-101.

GUDEV, D.; POPOVA-RALCHEVA, S.; MONEVA, P.; BONOVSKA, M.; VALCHEV, G.; VALCHEVA, A. 2004 Effect of supplemental Sangrovit on some biochemical indices and leukocytes phagocytic activity in growing pigs. *Archiva Zootechnica*, 7(1): 16-26.

IMANPOOR, M.R.; ROOHI, Z. 2016 Effects of Sangrovit-supplemented diet on growth performance, blood biochemical parameters, survival and stress resistance to salinity in the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Aquaculture Research*, 47(9): 2874-2880.

IMANPOOR, M.R.; SALAGHI, Z.; ROOHI, Z.; BEIKZADEH, A.; DAVOODIPOOR, A. 2015 Effect of herbal supplement of sangrovit on growth, blood biochemical parameters, survival and resistance to salinity stress of *Cyprinus carpio* fingerlings. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 24(3): 13-22.

KANG, Y.J.; YI, Y.L.; ZHANG, C.; WU, S.Q.; SHI, C.B.; WANG, G.X. 2013 Bioassay-guided isolation and identification of active compounds from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture Research*, 44(8): 1221-1228.

KARIMI, M.; FROUDI, F.; ABEDINI, M.R. 2014 Effect of Sangrovit on performance and morphology of small intestine and immune response of broilers. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 11(2): 855-861, 2014.

KONDO, H.; TINWONGGER, S.; PROESPRAIWONG, P.; MAVICHAK, R.; UNAJAK, S.; NOZAKI, R.; HIRONO, I. 2014 Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announcements*, 2(2, p): e00221-14.

KOSINA, P.; GREGOROVA, J.; GRUZ, J.; VACEK, J.; KOLARD, M.; VOGEL, M.; ROOS, W.; NAUMANN, K.; SIMANEK, V.; ULRICHOVA, J. 2010 Phytochemical and antimicrobial characterization of *Macleaya cordata* herb. *Fitoterapia*, 81(8): 1006-1012.

LING, F.; WU, Z.Q.; JIANG, C.; LIU, L.; WANG, G.X. 2016 Antibacterial efficacy and pharmacokinetic evaluation of sanguinarine in

common carp (*Cyprinus carpio*) following a single intraperitoneal administration. *Journal of fish diseases*, 39(8): 993-1000.

LONG, Y. et al. Study on sanguinarine residues in different animal's body. *Feed Industry*, v. 18, n. 1, 2015.

NUNAN, L.; LIGHTNER, D.; PANTOJA, C.; GOMEZ-JIMENEZ, S. 2014 Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 111(1): 81-86.

RAIRAT, T.; CHUCHIRD, N.; LIMSUWAN, C. 2013 Effect sangrovit WS on growth, survival and prevention of *Vibrio harveyi* in rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin*, 37(1): 19-29.

RAWLING, M.D.; MERRIFIELD, D.L.; DAVIES, S.J. 2009 Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit® on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. *Aquaculture*, 294(1-2): 118-122.

ROCHA, R.S.; DE SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.S.F. 2016 Multidrug-resistant *Vibrio* associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. *Marine pollution bulletin*, 105(1): 337-340.

SÖDERHÄLL, K.; HÄLL, L. 1984 Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 797(1): 99-104.

STALIN, N.; SRINIVASAN, P. 2016 Molecular characterization of antibiotic resistant *Vibrio harveyi* isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. *Microbial Pathogenesis*, 97(1): 110-118.

VIEIRA, S.L.; BERRES J.; REIS R.N.; OYARZABAL O.A.; CONEGLIAN J.L.B.; FREITAS D.M.; PEÑA J.E.M.; TORRES C.A. 2008 Studies with sanguinarine like alkaloids as feed additive in broiler diets. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 10(1): 67-71.

ZAR, J. H. 1999 *Biostatistical analysis*. 4^a ed. New Delhi, India: Pearson Education. 662p.

ZDARILOVA, A. et al. Natural feed additive of *Macleaya cordata*: safety assessment in rats a 90-day feeding experiment. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 12, p. 3721-3726, 2008.

ZHANG, C., LING, F., CHI, C., & WANG, G.X. 2013 Effects of praziquantel and sanguinarine on expression of immune genes and susceptibility to *Aeromonas hydrophila* in goldfish (*Carassius auratus*) infected with *Dactylogyrus intermedius*. *Fish & shellfish immunology*, 35(4): 1301-1308.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ABUDABOS, A. M. et al. The effect of phytogetic feed additives to substitute in-feed antibiotics on growth traits and blood biochemical parameters in broiler chicks challenged with *Salmonella typhimurium*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 23, p. 24151-24157, 2016.

AHMAD, N. et al. Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 4, p. 1524-1528, 2000.

AKTAŞ, M. et al. Effects of mannan oligosaccharide and serotonin on molting, growth, body composition and hepatopancreas histology of white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, n. 1, 2014.

BOONSRI, N. et al. Protein extract from red seaweed *Gracilaria fisheri* prevents acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) infection in shrimp. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 3, p. 1597-1608, 2017.

CASTILLO-JUÁREZ, H. et al. Genetic improvement of Pacific white shrimp [*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*]: perspectives for genomic selection. **Frontiers in genetics**, v. 6, n. 93, PMC4371756, 2015.

CHAKRABORTY, S. B.; HORN, P.; HANCZ, C. Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2014.

CHAWEEPCK, T. et al. Effect of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) extract on the expression of immune-related genes and *Vibrio harveyi* resistance in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture international**, v. 23, n. 1, p. 385-399, 2015.

CHONSIN, K., et al. Genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from farmed Pacific white shrimp and ambient pond water affected by acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Thailand. **FEMS microbiology letters**, v. 363, n.2: fnv222, 2015.

CITARASU, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. **Aquaculture International**, v. 18, n. 3, p. 403-414, 2010.

COCK, J.; SALAZAR, M.; RYE, M. Strategies for managing diseases in non-native shrimp populations. **Reviews in Aquaculture**, v. 9, n. 3, p. 211-226, 2015.

CROAKER, A. et al. *Sanguinaria canadensis*: traditional medicine, phytochemical composition, biological activities and current uses. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, p. 1414, 2016.

DE LA PEÑA, L. D. et al. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. **Diseases of aquatic organisms**, v. 116, n. 3, p. 251-254, 2015.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). **An Overview of Recently Published Global Aquaculture Statistics**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-bs235e.pdf>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2018.

GODOWSKI, K. C. Antimicrobial action of sanguinarine. **The Journal of clinical dentistry**, v. 1, n. 4, p. 96-101, 1989.

GUDEV, D. et al. Effect of supplemental Sangrovit on some biochemical indices and leukocytes phagocytic activity in growing pigs. **Archiva Zootechnica**, v. 7, n. 1, p. 16-26, 2004.

HSIEH, T. et al. Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. **Fish & shellfish immunology**, v. 25, n. 5, p. 581-588, 2008.

IMANPOOR, M. R.; ROOHI, Z. Effects of Sangrovit-supplemented diet on growth performance, blood biochemical parameters, survival and stress resistance to salinity in the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 9, p. 2874-2880, 2016.

JOHNSON, C. N. et al. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States). **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 20, p.7249-7257, 2012.

KANTAS, D. et al. The effect of a natural feed additive (*Macleaya cordata*), containing sanguinarine, on the performance and health status of weaning pigs. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 1, p. 92-98, 2015.

KONDO, H. et al. Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. **Genome Announcements**, v. 2, n. 2, p. e00221-14, 2014.

KORKUT, A. Y.; KOP A.; DUNGELHOEF M. Effect of Sangrovit on the growth and performance of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Disponível em: <<http://www.efeedlink.com/CPS/attachment/2012/March/2012051820492790411354.pdf>> Acesso em: 21 fev. 2018.

LIU, G. et al. *Macleaya cordata* extract decreased diarrhea score and enhanced intestinal barrier function in growing piglets. **BioMed research international**, v. 2016, Article ID 1069585, 2016.

LIU, X. et al. The effect of dietary *Panax ginseng* polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 30, n. 2, p. 495-500, 2011.

LONG, Y. et al. Study on sanguinarine residues in different animal's body. **Feed Industry**, v. 18, n. 1, 2015.

LEE, K. et al. Effects of dietary sanguinarine on growth performance, relative organ weight, cecal microflora, serum cholesterol level and meat quality in broiler chickens. **The Journal of Poultry Science**, v. 52, n. 1, p. 15-22, 2015.

MARTINEZ-URTAZA, J., et al. Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 265-274, 2008.

NATALE, F.; FIORE, G.; HOFHERR, J. Mapping the research on aquaculture. A bibliometric analysis of aquaculture literature. **Scientometrics**, v. 90, n. 3, p. 983-999, 2012.

NUNAN, L. et al. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 111, n. 1, p. 81-86, 2014.

ORMOND, J. G. P. et al. **A carcinicultura Brasileira**, BNDES Setorial, Rio de Janeiro, p. 91-118, 2004.

PELLIKAAN, W. F. et al. Effect of carob bean gum, spray dried porcine plasma and sanguinarine on fermentation activity in the gut of weanling pigs. **Livestock Science**, v. 133, n. 1, p. 164-168, 2010.

PONCE-PALAFOX, J.; MARTINEZ-PALACIOS, C. A.; ROSS, L. G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. **Aquaculture**, v. 157, n. 1-2, p. 107-115, 1997.

RAIRAT, T. et al. Effect sangrovit WS on growth, survival and prevention of *Vibrio harveyi* in rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Kasetsart University Fisheries Research Bulletin**, v. 37, n. 1, p. 19-29, 2013.

RAWLING, M. D.; MERRIFIELD, D. L.; DAVIES, S. J. Preliminary assessment of dietary supplementation of Sangrovit® on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and health. **Aquaculture**, v. 294, n. 1-2, p. 118-122, 2009.

ROCHA, R. S.; DE SOUSA, O. V.; VIEIRA, R. H. S. F. Multidrug-resistant *Vibrio* associated with an estuary affected by shrimp farming in Northeastern Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 105, n. 1, p. 337-340, 2016.

RODRIGUES, T. et al. Counting on natural products for drug design. *Nature chemistry*, v. 8, n. 6, p. 531-541, 2016.

SCHMELLER, T.; LATZ-BRÜNING, B.; WINK, M. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 257-266, 1997.

STALIN, N.; SRINIVASAN, P. Molecular characterization of antibiotic resistant *Vibrio harveyi* isolated from shrimp aquaculture environment in

the south east coast of India. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 110-118, 2016.

TEIXEIRA, A. P.; GUERRELHAS, A. C. B. Cultivo intensivo: pode ser a solução para o aumento da produção da carcinicultura. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro: SRG, v. 21, n. 123, p. 52-57, 2011.

TOMAZELLI JÚNIOR, O. et al. Survival of White Spot Syndrome Virus–infected *Litopenaeus vannamei* fed with ethanol extract of *Uncaria TomENTOSA*. **Journal of the World Aquaculture Society**, 2017.

VERMA, P. et al. Improved sanguinarine production via biotic and abiotic elicitations and precursor feeding in cell suspensions of latex-less variety of *Papaver somniferum* with their gene expression studies and upscaling in bioreactor. **Protoplasma**, v. 251, n. 6, p. 1359-1371, 2014.

VIEIRA, S. L. et al. Performance of broilers fed diets supplemented with sanguinarine-like alkaloids and organic acids. **Journal of applied poultry research**, v. 17, n. 1, p. 128-133, 2008.

WORM, B. Averting a global fisheries disaster. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 18, p. 4895-4897, 2016.

YAMADA, Y.; MOTOMURA, Y.; SATO, F. CjbHLH1 homologs regulate sanguinarine biosynthesis in *Eschscholzia californica* cells. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 5, p. 1019-1030, 2015.

ZDARILOVA, A. et al. Natural feed additive of *Macleaya cordata*: safety assessment in rats a 90-day feeding experiment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3721-3726, 2008.

ZHAO, L. et al. Safety evaluation of a standardized *Macleaya cordata* extract in a ninety day feeding study in weaned piglets. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 7, n. 02, p. 213, 2017.