



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

**ANA CAROLINE DOS REIS SILVA**

**ANÁLISE COMPARATIVA DA INOCUIDADE VIRAL DE *Artemia* sp. ALIMENTADA  
COM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS**

**FORTALEZA**

**2023**

ANA CAROLINE DOS REIS SILVA

ANÁLISE COMPARATIVA DA INOCUIDADE VIRAL DE *Artemia* sp.  
ALIMENTADA COM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientadora: Prof.º Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S578a Silva, Ana Caroline dos Reis.  
Análise comparativa da inocuidade viral de Artemia sp. alimentada com diferentes espécies de microalgas / Ana Caroline dos Reis Silva. – 2023.  
40 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante.

1. Sanidade. 2. Alimento vivo. 3. Virologia. I. Título.

CDD 639.2

---

ANA CAROLINE DOS REIS SILVA

ANÁLISE COMPARATIVA DA INOCUIDADE VIRAL DE *Artemia* sp.  
ALIMENTADA COM DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Aprovada em: xx/xx/xxxx.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.º Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Rafael dos Santos Rocha (Co-Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Suzete Roberta da Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. M.Sc. Cibele Castro Monteiro  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, Graça e Inácio.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Ceará - UFC, ao Centro de Ciências Agrárias - CCA, ao Departamento de Engenharia de Pesca.

À Profa. Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante pela orientação, apoio e confiança.

Ao Dr. Rafael dos Santos Rocha, pela excelente co-orientação, por toda a paciência nos momentos de dificuldades quando da elaboração deste trabalho, disposição e ensinamentos no decorrer da pesquisa e a todos os membros do CEDECAM.

Aos professores participantes da banca examinadora Suzete Roberta e Cibele Castro pelo tempo, pela disponibilidade, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao professor Manuel Furtado, *in memoriam*, pelo incentivo e inspiração no início do curso, por ser um norte e um espelho para minha vida pessoal e acadêmica, sou eternamente grata e levo comigo o seu legado.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Pesca. Especialmente, Oscar Pacheco, Aldeney Andrade pelo aprendizado, incentivo, confiança e inspiração e Hiran Costa pela oportunidade de estágio, apoio durante o curso e por ser um grande exemplo de profissional e amigo.

Ao grupo PET Engenharia de Pesca e ao tutor atual Reynaldo Marinho, pela capacitação e amadurecimento obtidos no decorrer do programa, aos colegas do programa, pela parceria, carinho e companheirismo, reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Aos amigos, Egídia Andrade e Rodrigo Gomes por serem meu alicerce nos momentos mais difíceis do curso, por crescerem e evoluírem junto comigo.

Aos amigos que conheci no decorrer do curso e que contribuíram na minha formação acadêmica e pessoal, Amanda Prazeres, Herlon Félix, Gabriel Cândido, Thifany Saldanha, Maria Leonilia, Leticia Andrade, Rissette Pinheiro, Rildisson Doris, Willame Quaresma, Amanda Cavalcante e Adila Holanda.

Ao meu amado, Maykel Simeão, que foi o meu incentivador e me apoiou principalmente durante a fase final do curso, por seu amor e paciência.

Aos meus pais, Inácio e Graça e minhas irmãs Ana Clara e Clarise por serem meu porto seguro, meu ombro amigo e minha base de vida, por sonharem junto comigo e acreditarem em mim desde o início, por suas orações e por serem meus maiores amigos de vida, sem eles isso jamais seria possível.

A minha tia Mara Cabral, por me receber em sua casa, pelos cuidados no meu primeiro ano de Graduação, quando minha família não estava presente.

“A educação é o nosso passaporte para o futuro, pois o amanhã pertence às pessoas que se preparam hoje.” (Malcolm X, 1965).

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.” (Eclesiastes, 3:1).

## RESUMO

A sanidade na carcinicultura é um fator limitante para o êxito da produção, a presença de patógenos virais em cultivos de *Penaeus vannamei* afeta o desempenho da atividade camaroneira no Brasil e no mundo. Diante disso, fatores exógenos ao cultivo são rotineiramente avaliados como meios de contaminação principalmente em larviculturas, entre possíveis vetores de enfermidades estão os alimentos vivos ofertados. Devido sua boa condição nutricional e tamanho ideal, o microcrustáceo do gênero *Artemia* é um potencial alimento em dietas de camarões, além do fácil manejo e cultivo. Além disso, microalgas são comumente adicionadas como fonte alimentar. Diante disso o presente trabalho objetivou avaliar a inocuidade viral de *Artemia sp.*, alimentada com as espécies de microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis gracilis* e *Thalassiosira sp.*, a fim de garantir que esses alimentos vivos podem ser ofertados em devidas condições sanitárias. As cepas das espécies de microalgas foram cultivadas em garrafões de 20 L, em meio de cultura F/2 Guillard, salinidade 20 ppm, por 15 dias em aeração e iluminação constantes. Para o cultivo das Artemias foram dispostos de cinco tratamentos com três repetições cada, em reatores de 5 L, com água marinha. A eclosão dos cistos foi baseada na metodologia utilizada por Takata (2007). A contagem de náuplios e metanáuplios foi realizada em uma câmara de Sedgewick Rafter. Os reatores foram alimentados de acordo com a densidade algal, as contagens foram realizadas em microscópio óptico e câmara de Neubauer. O DNA total foi extraído com o reagente DNazol. A quantificação do DNA foi realizada em aparelho espectrofotômetro. O RNA total foi extraído com o reagente Trizol. Para análise viral foram investigados os Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), Vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV) e Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV). As reações de qPCR foram realizadas contendo os reagentes específicos para cada patógeno. Para a quantificação do número de cópias do WSSV e IMNV foi empregada a plataforma 7500 *Real-time PCR system* (Applied Biosystems®). Todas as amostras foram testadas em duplicata e somente consideradas positivas quando houve amplificação válida de ambas as réplicas. Para IHHNV as amostras amplificadas foram submetidas à análise da Temperatura de Melting, a fim de se verificar a curva de especificidade dos amplificadores gerados. O estudo mostrou que não houve detecção viral nas amostras, o que demonstra estado sanitário satisfatório para os microcrustáceos e as microalgas serem utilizados futuramente como alimento vivo, validando, portanto, o procedimento utilizado na presente pesquisa.

**Palavras-chave:** Sanidade; Alimento vivo; Virologia.

## ABSTRACT

The health of shrimp farming is a limiting factor for the success of production, the presence of viral pathogens in *Peneus vannamei* crops affects the performance of shrimp farming in Brazil and in the world. Therefore, factors exogenous to the crop are routinely evaluated as means of contamination, especially in larvicultures, among possible vectors of diseases are the live food offered. Due to its good nutritional condition and ideal size, the microcrustacean of the genus *Artemia* is a potential food in shrimp diets, in addition to being easy to manage and cultivate. In addition, microalgae are commonly added as a food source. Therefore, the present study aimed to evaluate the viral harmlessness of *Artemia sp.*, fed with the microalgae species *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis gracilis* and *Thalassiosira sp.*, in order to ensure that these live foods can be offered under proper sanitary conditions. The strains of the microalgae species were cultivated in 20 L carboys, in F/2 Guillard culture medium, salinity 20 ppm, for 15 days in constant aeration and lighting. For the cultivation of *Artemias*, five treatments with three replications each were arranged in 5 L reactors with seawater. The outbreak of the cysts was based on the methodology used by Takata (2007). Nauplii and metanauplii were counted in a Sedgewick Rafter chamber. The reactors were fed according to algal density, and the counts were performed under an optical microscope and a Neubauer camera. Total DNA was extracted with the DNAzol reagent. DNA quantification was performed in a spectrophotometer. Total RNA was extracted with the Trizol reagent. For viral analysis, White Spot Syndrome Virus (WSSV), Infectious Myonecrosis Virus (NMV) and Hyperdermal Infection and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) were investigated. The qPCR reactions were performed containing the specific reagents for each pathogen. The qPCR reactions were performed containing the specific reagents for each pathogen. To quantify the copy number of WSSV and IMNV, the 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems®) platform was used. All samples were tested in duplicate and were only considered positive when there was valid amplification of both replicates. For IHHNV, the amplified samples were submitted to Melting Temperature analysis in order to verify the specificity curve of the amplified generated. The study showed that there was no viral detection in the samples, which demonstrates a satisfactory sanitary status for microcrustaceans and microalgae to be used as live food in the future, thus validating the procedure used in the present research.

**Keywords:** Sanity; Live food; Virology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Ciclo de vida do microcrustáceo <i>Artemia</i> .....	17
Figura 2	– Eclosão de cistos de artemia. ....	18
Figura 3	– Imagem da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> .....	20
Figura 4	– Imagem da microalga <i>Chaetoceros muelleri</i> .....	20
Figura 5	– Cultivo das espécies de microalgas no Laboratório de Planctologia da Universidade Federal do Ceará .....	23
Figura 6	– Contagem da microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> em câmara de Neubauer .....	24
Figura 7	– Esquema da configuração do cultivo experimental.....	25
Figura 8	– Configuração do cultivo experimental.....	25
Figura 9	– Remoção do córion utilizando hipoclorito de sódio .....	26
Figura 10	– Náuplios e metanáuplios de <i>Artemia</i> sp. em microscópio óptico .....	27
Figura 11	– Amostras armazenadas em álcool mantidas sob refrigeração .....	28
Figura 12	– Etapas da Extração de DNA .....	29
Figura 13	– Etapas da Extração de RNA.....	30
Figura 14	– Comportamento de estresse dos organismos alimentados com <i>Chaetoceros muelleri</i> .....	33
Figura 15	– Gráficos referentes à qPCR desenvolvida para análise do inóculo de WSSV utilizado no presente estudo. (A) Gráfico de amplificação e (B) Regressão das curvas padrões .....	34
Figura 16	– Gráficos referentes à RT-qPCR desenvolvida para análise do inóculo de IMNV utilizado no presente estudo. (A) Gráfico de amplificação e (B) Regressão das curvas padrões .....	35
Figura 17	– Gráficos referentes à qPCR desenvolvida para análise do inóculo de IMNV utilizado no presente estudo. (A) Gráfico de amplificação e (B) Curva de Melting .....	36

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	–	Sobrevivência de metanúplios em diferentes alimentações.....	33
----------	---	--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1</b>	<b>Carcinicultura</b> .....	16
<b>2.2</b>	<b>Produção de alimento vivo para aquicultura</b> .....	16
<b>2.2.1</b>	<i>Cultivo de artemias</i> .....	16
<b>2.2.2</b>	<i>Cultivo de Microalgas</i> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Patologias virais em crustáceos</b> .....	21
<b>2.3.1</b>	<i>Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)</i> .....	21
<b>2.3.2</b>	<i>Vírus da Mionecrose infecciosa (IMNV)</i> .....	22
<b>2.3.3</b>	<i>Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)</i> .....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
<b>3.1</b>	<b>Local da pesquisa</b> .....	23
<b>3.2</b>	<b>Cultivo de microalgas</b> .....	23
<b>3.3</b>	<b>Delineamento experimental</b> .....	24
<b>3.3.1</b>	<i>Desenho experimental</i> .....	24
<b>3.4</b>	<b>Cultivo de <i>Artemia</i> sp.</b> .....	26
<b>3.5.1</b>	<i>Metodologia utilizada para a eclosão dos cistos</i> .....	26
<b>3.5.2</b>	<i>Descapsulação dos cistos de <i>Artemia</i> sp.</i> .....	26
<b>3.5</b>	Contagem de artemias na fase de náuplio e metanáuplio .....	27
<b>3.6</b>	Determinação da sobrevivência das artêmias por microalga .....	27
<b>3.7</b>	Ensaio de sanidade por Biologia Molecular .....	28
<b>3.7.1</b>	<i>Amostras</i> .....	28
<b>3.7.2</b>	<i>Extração de DNA</i> .....	28
<b>3.7.3</b>	<i>Extração de RNA e Síntese de cDNA</i> .....	29
<b>3.7.4</b>	<i>Análise viral</i> .....	30
<b>3.7.4.1</b>	<i>Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)</i> .....	30
<b>3.7.4.2</b>	<i>Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV)</i> .....	31
<b>3.7.4.3</b>	<i>Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)</i> .....	31

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>4.1</b>	<b>Sobrevivência de meta-náuplios com diferentes alimentações</b> .....	32
<b>4.2</b>	<b>Investigação de patógenos virais</b> .....	34
<b>4.2.1</b>	<i>Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)</i> .....	34
<b>4.2.2</b>	<i>Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV)</i> .....	34
<b>4.2.3</b>	<i>Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)</i> .....	35
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	37
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38

## 1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura atualmente é um dos principais empreendimentos aquícolas mundial, sendo *Penaeus vannamei* a espécie mais cultivada. Segundo estimativa da Associação Brasileira de Criadores de Camarão, a atividade no país apresentou uma produção de camarões de aproximadamente 4000 kg/hectare em 2020. Durante o cultivo há diversos fatores que podem ser determinantes para garantir a eficácia, sobrevivência e um produto de qualidade (ABCC, 2022).

Dentre os processos que envolvem o cultivo do camarão, a sanidade é um dos fatores que mais preocupam os produtores, pois influencia diretamente na qualidade do cultivo e rentabilidade. A aparição de doenças pode estar relacionada a vírus, bactérias, fungos e protozoários. A proliferação desses organismos pode comprometer toda a população cultivada e acarretar a perda parcial ou total da produção (DE NEGREIROS *et al.*, 2015).

A larvicultura é um estágio de vida delicado e crucial para direcionar as demais etapas de vida do animal cultivado já que nessa fase pode haver alta mortalidade, a partir disso é indispensável que desde o período larval haja maior atenção e controle a fim de garantir a biossegurança do meio para evitar qualquer tipo de contaminação (MEJÍA, 2021). A alimentação no estágio larval pode ser um dos meios de entradas de contaminantes, se não for introduzida de forma adequada (DE NEGREIROS *et al.*, 2015).

No início da vida o camarão precisa ser alimentado de acordo com a demanda nutricional e suas características fisiológicas. O crustáceo do gênero *Artemia* se adequa como alimento vivo alternativo devido a sua condição nutricional, tamanho compatível, facilidade de manejo, curto tempo de cultivo, rápido estágio de vida e outros fatores. A *Artemia* sp. possui diversas propriedades benéficas devido suas taxas de proteína, aminoácidos e ácidos graxos poli-insaturados (JUNIOR, 2017).

Para que este microcrustáceo não perca suas propriedades e alto valor nutricional, é necessário que seja realizado a implementação de uma dieta que atenda às suas necessidades (DUERR *et al.*, 1998; LAVENS;SORGELLOOS, 1996). Um dos fatores que influenciam o bom crescimento do animal é a alimentação, na qual é imprescindível que sejam ofertados alimentos de partículas compatíveis ao seu tamanho, além de uma fácil digestibilidade e adequação ao meio salino (SÚ, 1986).

Devido a facilidade de cultivo, rápido crescimento e alta disponibilidade, as microalgas são muito utilizadas no cultivo de *Artemia* sp. Algumas microalgas possuem lipídios, ácidos graxos e aminoácidos essenciais para atender a demanda nutricional do ciclo de vida do crustáceo. Portanto, o valor nutricional da microalga utilizada é um fator de alta

relevância para a eficácia do objetivo esperado (CAMPOS *et al.*, 2010). Além disso, as microalgas apresentam boa solubilidade na água, facilitando a digestão e filtração do conteúdo ofertado para a *Artemia* (JUNIOR, 2017).

Contudo, sendo a *Artemia* um microcrustáceo, é possível que os mesmos organismos virais que atuam no camarão cultivado *Penaeus vannamei* ou *P. monodon* possam ser veiculados durante o processo de alimentação. Dessa forma, a garantia da inocuidade viral é uma etapa importante e necessária para validação do uso desse organismo como fonte de alimento.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho é avaliar a atuação do microcrustáceo *Artemia* sp. como vetor de patógenos virais em diferentes estágios do seu ciclo de vida, analisando o impacto da alimentação com microalgas das espécies *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis gracilis* e *Thalassiosira* sp., a fim de garantir a inocuidade desses organismos, quando em condições laboratoriais e a disponibilidade destes como alimento vivo para camarões peneídeos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Carcinicultura

A carcinicultura é uma atividade econômica relevante, principalmente em regiões costeiras, devido à alta demanda do mercado por camarões (FAO, 2014). O sucesso deste setor da aquicultura depende em grande parte da nutrição adequada dos organismos cultivados, sendo a *Artemia* sp. um dos principais alimentos utilizados na larvicultura de camarão (LAVENS; SORGELOOS, 1996). Este microcrustáceo apresenta alto valor nutricional e é facilmente digerido pelos camarões jovens (VAN STAPPEN, 1996). Entretanto, a *Artemia* sp. pode atuar como vetor de agentes patogênicos, incluindo vírus que podem comprometer a produção em larga escala (NUNAN *et al.*, 1998).

### 2.2 Produção de alimento vivo para aquicultura

#### 2.2.1 Cultivo de artemias

Os microcrustáceos *Artemia* sp. são semelhantes a camarões e pertencem à classe Branchiopoda e são encontrados em vários ambientes salinos. A artemia é frequentemente utilizada na aquicultura e como alimento vivo devido ao seu valor nutricional. Os Branchiopoda geralmente possuem apêndices filiformes em forma de escova ou folhas branquiáceas, que são usados para a respiração (ABATZOPOLULOS T *et al.*, 2002). A classe Branchiopoda é bastante diversificada e inclui diferentes grupos, como os cladóceros como a *Daphnia* e os anostráceos como a *Artemia*. Esses organismos são filtradores, alimentando-se de partículas orgânicas suspensas na água (TORRES, 2017). Logo abaixo encontra-se a classificação taxonômica da *Artemia* sp. segundo NCBI: txid 6662.

**Reino:** Animalia

**Filo:** Arthropoda

**Classe:** Branchiopoda

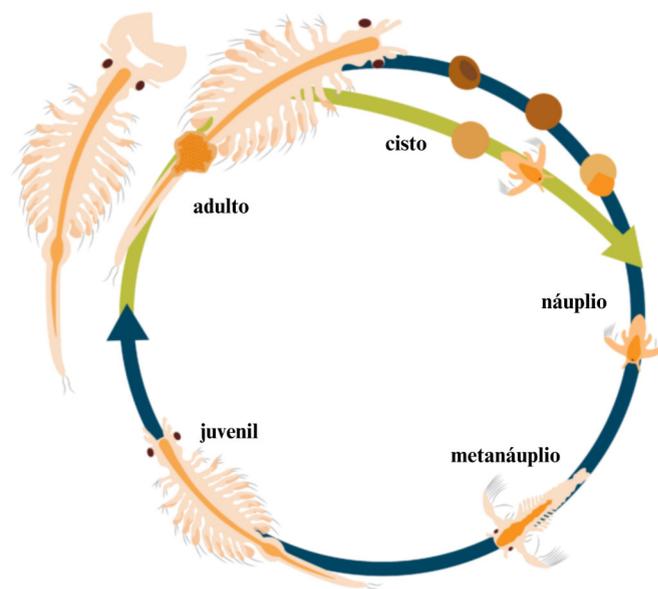
**Ordem:** Anostraca

**Família:** Artemiidae

**Gênero:** *Artemia*

*Artemia* demonstra ser um potencial alimento vivo, pois é rica em elementos nutricionais, como os ácidos graxos poli-insaturados (HUFA), indispensáveis para crescimento e sobrevivência de larvas de espécies em cultivo, além disso apresenta um tamanho ideal para alimentação de pós-larvas, rápido ciclo de vida, como demonstrado na Figura 1, cultivo e manejo facilitado e conhecido na literatura (PHELPS, 2010). Náuplios e adultos podem satisfazer as exigências nutricionais de diversas espécies aquáticas (SORGELOOS, 1998; SORGELOOS *et al.*, 2001).

**Figura 1.** Ciclo de vida do microcrustáceo *Artemia*.



Fonte: [www.artemia.inveaquaculture.com](http://www.artemia.inveaquaculture.com)

Além dos fatores nutricionais, as artêmias se tornam mais preferíveis em alguns regimes de alimentação em aquicultura se comparadas a dietas formuladas. Isso porque as rações estão sujeitas a perda de nutrientes ao longo da coluna d'água e o tempo de contato, podendo se agregar na superfície (BENGTSON, 2003). Já o alimento vivo pode nadar e estar disponível por mais tempo para as larvas de camarões, desse modo esses organismos podem estimular respostas de alimentação, sendo assim mais palatáveis e atrativas. Além disso, a biomassa de artêmia pode ser favorável à maturação sexual, por conter substâncias hormonais, como indução e aumento das taxas de fertilização em peixes e camarões (NAESSENS *et al.*, 1997; GANDY *et al.*, 2007).

A reprodução da *Artemia* sp. pode ocorrer de duas formas, sexuada e a partenogênica, a maneira em que a reprodução irá ocorrer será definida pelas condições locais e ambientais em que o animal se encontra (MUNTEANU, 2011). Na fase inicial em que podem ser recolhidos (cistos), processados, acondicionados e armazenados como organismos dormentes ou vivos, prontos para serem usados como ração em incubatórios de organismos aquáticos, como visualizado na Figura 2. Cistos de *Artemia* suportam condições críticas, o que lhes confere fácil armazenamento para futuras eclosões, contanto que não estejam em contato com umidade (CÂMARA, 2008).

**Figura 2.** Eclosão de cistos de *Artemia*.



Fonte: [www.artemia.inveaquaculture.com](http://www.artemia.inveaquaculture.com)

Segundo Avila-Villa *et al.*, (2011), existe a possibilidade de *Artemia* atuar como reservatório ou vetor para a transmissão de vários patógenos virais e infecções bacterianas, como a hepatopancreatite necrosante (NHP), enfermidade bacteriana grave, que acomete os camarões marinhos. A atuação de artêmias como vetores para o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) foi examinada e demonstrou que pode haver transmissão horizontal (HAMEED, 2000). Portanto é necessária a triagem das fontes de alimentação que adentram os cultivos, principalmente quando se trata de larviculturas a fim de evitar contaminações cruzadas.

### 2.2.2 Cultivo de Microalgas

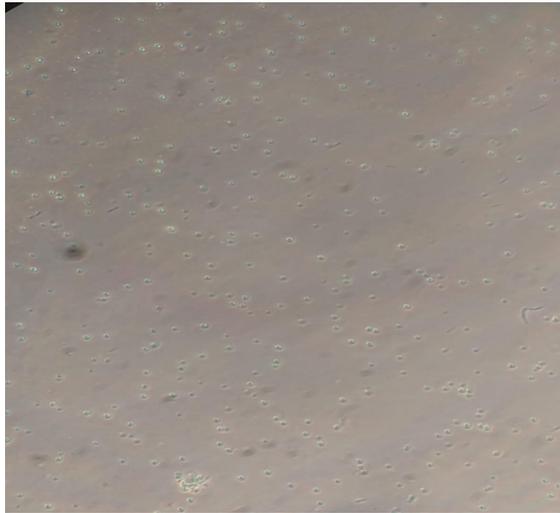
As microalgas estão presentes em dietas alimentares de larviculturas pois são uma fonte primária de nutrientes para muitos organismos aquáticos e têm sido amplamente utilizadas na aquicultura (MULLER-FEUGA *et al.*, 2003). As diferenças na composição nutricional entre as espécies de microalgas podem influenciar diretamente os organismos que as consomem (SORGELLOOS *et al.*, 2001).

Em suma, a alimentação de *Artemia* sp. com microalgas, organismos autotróficos fotossintetizantes, sendo facilmente encontrados em ambientes aquáticos, e na maioria das vezes unicelulares, é uma prática comum na aquicultura (SCHMITZ *et al.*, 2012). O sucesso na produção de pós-larvas de camarão está diretamente ligado à produção em larga escala de espécies de microalgas que possam atender suas exigências nutricionais desses organismos, visto que em seus primeiros estágios de vida, microalgas marinhas são fontes de alimento indispensáveis (BEZERRA, 2008).

Microalgas marinhas são fontes de macronutrientes (proteínas, lipídios e carboidratos) e de micronutrientes (vitaminas e minerais), comumente utilizadas na dieta de camarões a partir do estágio larval (zoea). Outrossim, as microalgas também servem de alimento para outros organismos que podem estar presentes no cultivo de camarão como as artêmias. Podem desempenhar funções de biorremediação, reciclando compostos nitrogenados ou quelando metais presentes na água, que podem culminar na proliferação de bactérias (BARBIERI JR; OSTRENSKI NETO, 2001; BEZERRA, 2008).

A *Nannochloropsis oculata* (Figura 3) é uma espécie de microalga marinha verde unicelular pertencente à classe Eustigmatophyceae, tem uma forma esférica, é usada como alimento vivo na aquicultura, devido a sua facilidade de manejo e rápido cultivo, sendo de pequeno tamanho o que a torna ideal para alimentação de larvas, sendo comumente usada para alimentar camarões. Muitos estudos trazem um foco na composição nutricional que este organismo oferece, como a presença de astaxantina, corante com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, muito utilizado na saúde humana (LUBIAN *et al.*, 2000).

**Figura 3.** Imagem da microalga *Nannochloropsis oculata*.



Fonte: Autor, 2023.

A diatomácea *Chaetoceros muelleri* (Figura 4), pertencente à classe Mediophyceae, é bastante utilizada em larviculturas de crustáceos, devido a vantagens como facilidade de produção, crescimento rápido e elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados. Na sua morfologia, elas apresentam forma retangular sendo dotadas de setas rígidas, com tamanho variando entre 8,4-19,5  $\mu\text{m}$  (BARBIERI JR; OSTRENSKI-NETO, 2001).

**Figura 4.** Imagem da microalga *Chaetoceros muelleri*.



Fonte: Autor, 2023.

## 2.3 Patologias virais em crustáceos

Estudos anteriores apontaram que o uso de microcrustáceos como *Artemia* sp. como alimento vivo para camarões pode significar um meio de contaminação ou de condução de patologias virais já conhecidas na carcinicultura mundial. Zhang *et al.* (2010) submeteram *Artemia* sp. a um experimento de infecção viral em diferentes estágios do seu ciclo de vida. Do mesmo modo, ensaios experimentais detectaram a presença do parvovírus hepatopancreático (HPV) em diferentes fases de vida de *Artemia franciscana* por meio de PCR (SIVAKUMAR *et al.*, 2009).

Os efeitos de enfermidades virais que acometem camarões peneídeos podem significar um declínio da lucratividade. Segundo Choi, 2017, as doenças que acometem camarões cultivados no mundo são responsáveis por perdas de bilhões de dólares. Além da investigação da suscetibilidade a enfermidades no decorrer da cadeia produtiva, é necessário o manejo adequado para que haja a seleção de animais livres de patógenos, desde os reprodutores até os animais adultos (SIQUEIRA, 2019)

### 2.3.1 Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)

No ano de 2005 foi registrada a primeira aparição do vírus da mancha branca (WSSV) em cultivos de *Penaeus vannamei* do estado de Santa Catarina, não se sabia o comportamento do vírus até que ele se tornasse devastador (COSTA, 2012). Hoje, conhecido mundialmente, o vírus da mancha branca (WSSV) é um patógeno comum em fazendas de camarão, pela atuação do vírus a doença é responsável por grandes perdas de produção, sendo considerada, portanto, a mais grave para camarões (FLEGEL, 2009).

A transmissão pode ocorrer de diversas formas, sendo os fatores exógenos um dos possíveis veículos de transmissão, como alimentação, além de outros organismos que podem entrar no cultivo já estando contaminados (MOMOYAMA, 2003). O vírus da síndrome da mancha branca é atualmente a patogenia mais popular no contexto da carcinicultura. As primeiras aparições de WSSV no Estado de Santa Catarina comprometeram significativamente as produções locais, apresentando uma queda de 33%, em 2004, onde aconteceram os maiores registros da doença (MELLO, 2012). A partir disso é inegável que a prevenção e mitigação de doenças deve ser a principal prioridade na carcinicultura.

### 2.3.2 *Vírus da Mionecrose infecciosa (IMNV)*

Segundo Da Silva (2015), em 2004 o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), foi apontado como a principal causa da diminuição da produção de *Penaeus vannamei* em território nacional. O vírus apresenta sintomas como a aparição de grandes áreas do músculo esquelético necrosadas, o que torna os camarões moribundos e causa a perda da transparência da musculatura abdominal, tornando os camarões suscetíveis a rápida mortalidade. O primeiro registo de IMNV no Brasil, ocorreu no ano de 2002, no estado do Piauí, em fazendas de *Penaeus vannamei*.

Segundo Ligthner, 2012, o avanço da doença causada pelo Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) gerou altos índices de mortalidade, estimados de 30 a 70%, culminando em perdas econômicas no mercado local e mundial. O patógeno causa necroses no decorrer no corpo dos animais infectados, geralmente na parte abdominal e caudal, comprometendo sua atividade natatória e alimentar, tornando o animal desprezível para indústrias de pescado (SANTOS, 2022).

### 2.3.3 *Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)*

Diversas doenças acometem os camarões cultivados no Brasil e no mundo, pesquisas consideram os patógenos virais em camarões um dos principais fatores de limitação de lucros (FEIJÓ, 2007). Dentre eles, o Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) é considerado um patógeno de baixo impacto em camarões cultivados, o vírus causa uma enfermidade crônica chamada "síndrome da deformidade e do nanismo" (RDS), onde os sintomas se apresentam por meio de deformidades nas cutículas, enrugamento das antenas, carapaça áspera e retardo no crescimento (KALAGAYAN *et al.*, 1991; FEIJÓ, 2007). Apesar do baixo impacto, essa enfermidade pode comprometer e gerar diminuição de produção na carcinicultura local.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

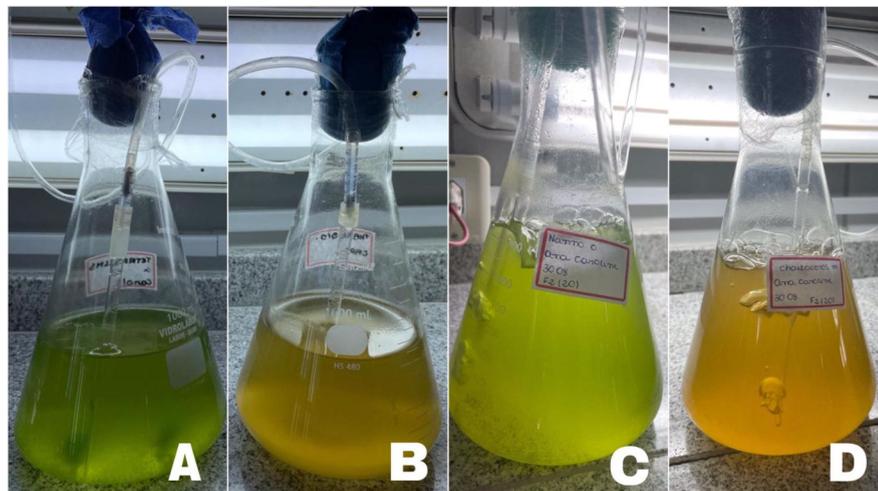
#### 3.1 Local da pesquisa

O experimento da presente pesquisa foi realizado em duas etapas: (1) Foi realizado o cultivo de *Artemia* sp., alimentada com microalgas marinhas que também foram cultivadas nesta etapa experimental. Os cultivos foram feitos no Laboratório de Planctologia, no Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura (CEBIAQUA), da Universidade Federal do Ceará (UFC). (2) As metodologias relacionadas aos estudos moleculares, foram realizadas no Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM), da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### 3.2 Cultivo de microalgas

As microalgas *Chaetoceros muelleri*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis gracilis* e *Thalassiosira* sp., foram obtidas do cepário do Laboratório de Planctologia da Universidade Federal do Ceará e foram cultivadas em reatores de vidro de 1 L (Figura 5), com aeração e iluminação constantes. O meio de cultura utilizado foi o Guillard F/2 com salinidade de 20 ppm. O tempo de cultivo foi de aproximadamente 15 dias para que houvesse crescimento e densidade algal adequada para a alimentação das *Artemia* em estágio de metanúplio.

**Figura 5.** Cultivo das espécies de microalgas no Laboratório de Planctologia da Universidade Federal do Ceará.

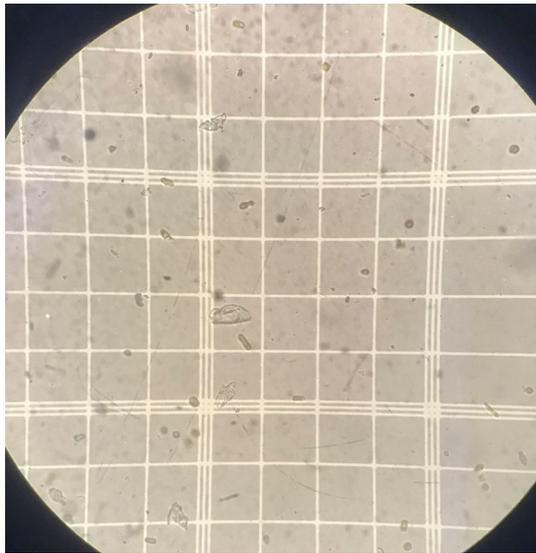


Fonte: Autores, 2023.

A - *Tetraselmis gracilis*, B - *Thalassiosira sp.*, C - *Nannochloropsis oculata* e D - *Chaetoceros muelleri*

A contagem celular das microalgas foi realizada a cada dois dias (intervalo em que as microalgas foram ofertadas aos microcrustáceos como fonte alimentar) com o auxílio de um microscópio eletrônico e câmara de Neubauer (Figura 6).

**Figura 6.** Contagem da microalga *Nannochloropsis oculata* em câmara de Neubauer.



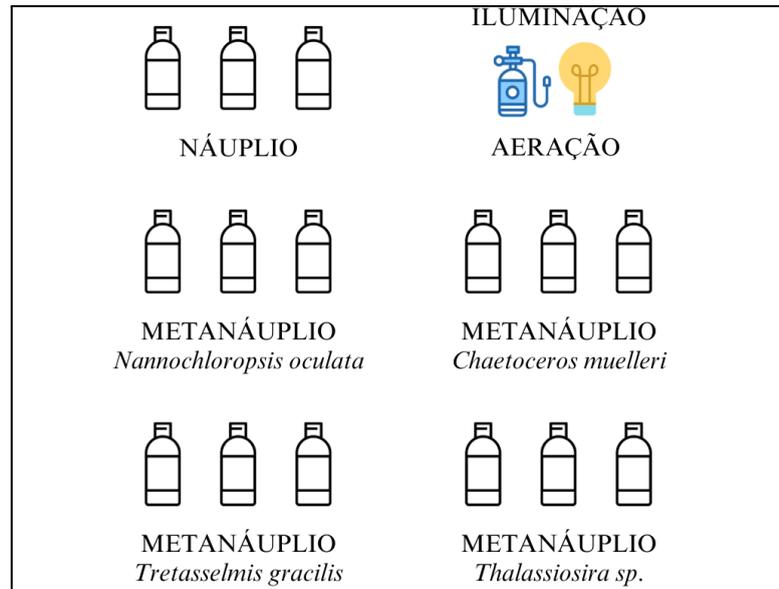
Fonte: Autor, 2023.

### 3.3 Delineamento experimental

#### 3.3.1 Desenho experimental

Para o ensaio foram dispostos cinco tratamentos com três repetições cada, em reatores de 5 L (Figura 7 e 8), seguindo a seguinte configuração: 1) Náuplio de *Artemia sp.*, após a eclosão, sem alimentação (controle), 2) Meta-náuplio de *Artemia sp.*, alimentado com *Nannochloropsis oculata*, 3) Meta-náuplio de *Artemia sp.*, alimentado com *Chaetoceros muelleri*, 4) Meta-náuplio de *Artemia sp.*, alimentado com *Tetraselmis gracilis*, e 5) Meta-náuplio de *Artemia sp.*, alimentado com *Thalassiosira sp.*

**Figura 7.** Esquema da configuração do cultivo experimental.



Fonte: Autor, 2023.

**Figura 8.** Configuração do cultivo experimental.



Fonte: Autor, 2023.

### 3.4 Cultivo de *Artemia* sp.

#### 3.4.1 Eclosão dos cistos de *Artemia* sp.

Para realizar a eclosão dos cistos foram dispostos 15 reatores de polietileno de 5 L cada, como base foi feita uma adaptação a metodologia utilizada por Takata (2007). Foram adicionados 4 L de água marinha, provenientes do Centro de Estudos Ambientais Costeiros (CEAC), e mensurados os parâmetros físico-químicos da água, cuja salinidade foi igual a 33 ppm, pH 7,6 e temperatura de 28 °C. Todo o ensaio experimental contou com aeração e iluminação constantes. A utilização da água marinha poderia ser um fator de presença viral, visto que essa água já é utilizada em cultivos de camarões que apresentam a incidência de patologias, no Município de Eusébio.

#### 3.4.2 Descapsulação dos cistos de *Artemia* sp.

Para a descapsulação dos cistos foram utilizados 15 reatores de polietileno de 1 L com água da rede de abastecimento local, em seguida foi feita uma pesagem de 2g de cistos (em cada reator) para serem descapsulados em 1 L de água, que posteriormente foram distribuídos igualmente nos reatores. Em seguida os cistos foram hidratados por um período de 2 horas com aeração constante. Após isso, foram filtrados em uma malha de 120 µm e adicionados 100 ml de hipoclorito de sódio a 2,5% (NaOCl) seguido por constante agitação por 3 minutos para que o córion pudesse ser removido (Figura 9). Logo após esse processo os cistos foram lavados em água corrente para que houvesse total remoção do hipoclorito de sódio.

**Figura 9.** Remoção do córion utilizando hipoclorito de sódio.



### 3.5 Contagem de *Artemia* sp. na fase de náuplio

Após 24 horas do início da eclosão, foram obtidos os náuplios (tratamento controle). Os três reatores foram filtrados em uma malha de 120  $\mu\text{m}$  e armazenados em uma becker com o volume útil de 200 mL. A partir desse volume, foi retirado 1 ml de amostra, somado a 1 ml de lugol, sendo postos em uma câmara de Sedgewick Rafter. Assim foram realizadas duas contagens de náuplios a fim de se obter a média de náuplios/ml. O material foi novamente filtrado e armazenado em um microtubo com tampa do tipo *eppendorf* de 2 ml, onde foram adicionados 0,5 ml de amostra e 1 ml álcool a 96%, sendo mantidos sob refrigeração para futuras análises moleculares.

### 3.6 Determinação da sobrevivência de *Artemia* sp. por microalga

Após 48 horas do processo de eclosão, as artêmias chegaram à fase de metanáuplio e cada reator foi alimentado de acordo com a densidade em que as microalgas se encontraram. Para isso, as contagens de microalgas eram realizadas em microscópio óptico e câmara de Neubauer, realizando um cálculo de densidade (cél/ml). Após 24h da primeira alimentação e 48h da segunda alimentação, os doze reatores com metanáuplios foram filtrados em uma malha de 120  $\mu\text{m}$  e armazenados em uma becker com o volume utilizado de 200 mL.

A partir desse volume, foi retirado 1 ml de amostra, somado a 1 ml de lugol, sendo postos em uma câmara de Sedgewick Rafter. Assim, foram realizadas duas contagens de indivíduos, a fim de se obter a média de metanáuplios/ml e estimar se a sobrevivência foi um fator relevante em diferentes tratamentos com microalgas. O material foi novamente filtrado e armazenado em um *eppendorf* de 2 ml, onde foram adicionados 0,5 ml de amostra e 1 ml álcool, sendo mantidos sob refrigeração para futuras análises moleculares.

**Figura 10.** Náuplios e metanáuplios de *Artemia* sp. em microscópio óptico.



### 3.7 Ensaio de sanidade por Biologia Molecular

#### 3.7.1 Amostras

As amostras de náuplios, metanáuplios e microalgas (Figura 11) foram descongeladas para realização das análises. O material de bancada foi preparado e esterilizado em câmara UV a fim de evitar contaminações.

**Figura 11.** Amostras armazenadas em álcool mantidas sob refrigeração.



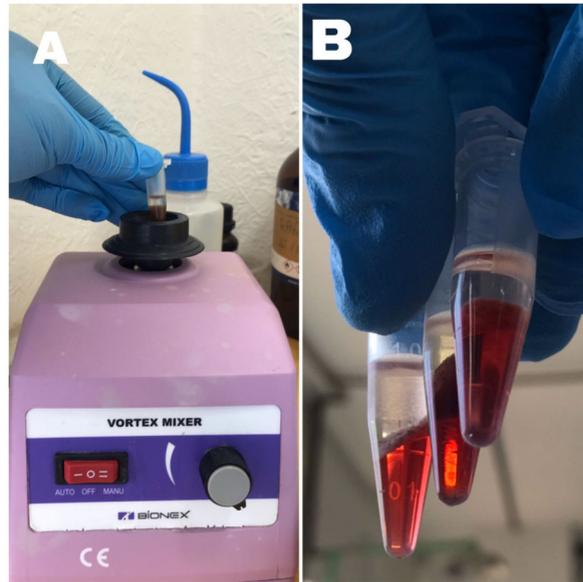
Fonte: Autor, 2023.

#### 3.7.2 Extração de DNA

O DNA total foi extraído com o reagente DNAzol (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. Aproximadamente 50 mg de tecido, previamente macerado, foi misturado com 500  $\mu\text{L}$  de DNAzol em um microtubo, agitado em vortex e mantido em repouso por 30 min à temperatura de 25  $^{\circ}\text{C}$ . Após esse tempo, os microtubos foram centrifugados a 13.000xg por 10 min; o sobrenadante foi recuperado (aproximadamente 500  $\mu\text{L}$ ) e inserido, em outro microtubo limpo, contendo 500  $\mu\text{L}$  de álcool etílico 95%, levemente misturado por inversão. Os microtubos, após repouso de 5 min, foram centrifugados a 13.000xg por 5 min; o sobrenadante foi desprezado e ao *pellet* foi sobreposto 500  $\mu\text{L}$  de álcool etílico 70%. Após repouso de 5 min, os microtubos foram centrifugados a 13.000xg por 5 min (Figura 12); o sobrenadante foi desprezado e os microtubos foram mantidos invertidos para drenagem/evaporação dos resquícios de álcool e secagem do *pellet*. Após secagem, ao *pellet* foram sobrepostos 200  $\mu\text{L}$  de NaOH 8 mM e 20  $\mu\text{L}$  de HEPES 0,1M. A

quantificação do DNA foi realizada em aparelho espectrofotômetro NANODROP®. Os microtubos com DNA extraídos foram mantidos à temperatura de -20 °C.

**Figura 12.** Etapas da Extração de DNA.



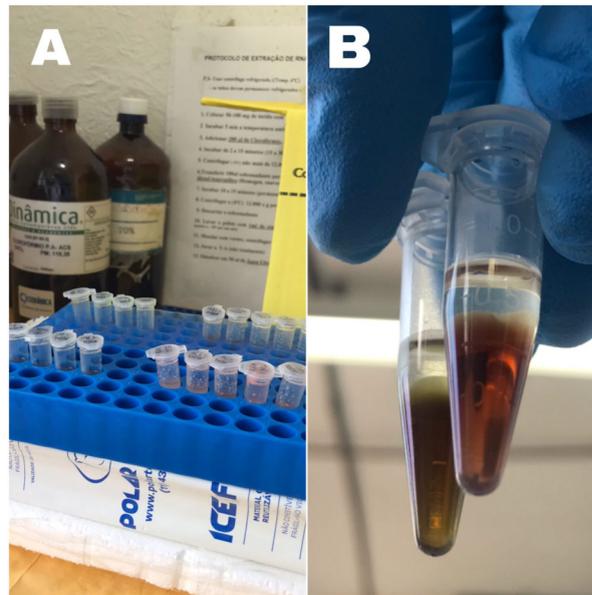
Fonte: Autor, 2023.

A - Agitação da amostra em aparelho vortex; B - Amostras de metanúplios após centrifugação.

### 3.7.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA

RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante. Após, o RNA foi tratado com DNase I por incubação a 37 °C por 30 min e sua concentração foi determinada por quantificação espectrofotométrica (Nanodrop ®). Antes da síntese do cDNA, o RNA foi aquecido a 100 °C por 5 minutos para desnaturar o dsRNA e, posteriormente, resfriado em gelo. O cDNA foi sintetizado com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies®) em um volume de 10 µL de reação final contendo 1 µL de RT Buffer (10×), 0,4 µL de dNTPs mix (25×), 1 µL de RT random primers (10×), 0,5 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U) e 1 µg de RNA total. As amostras foram incubadas em termociclador a 25 °C por 10 min, seguidos de 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min. O cDNA foi armazenado a -20 °C até a sua utilização para as análises de quantificação viral por PCR em Tempo Real (Figura 13).

**Figura 13.** Etapas da Extração de RNA.



Fonte: Autor, 2023.

A - Amostras resfriadas em gelo; B- Amostras após centrifugação.

### 3.7.4 Análise viral

#### 3.7.4.1 Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)

As reações de qPCR foram realizadas em 10  $\mu\text{L}$  de volume final contendo 5  $\mu\text{L}$  de TaqMan Universal Master Mix (Invitrogen®), 0,3  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{M}$ ) de cada *primer* WSSV1011F (5'- TGG TCC CGT CCT CAT CTC AG -3') e WSSV1079R (5'- GCT GCC TTG CCG GAA ATT A-3'), 0,15  $\mu\text{L}$  (10 $\mu\text{M}$ ) da sonda de hidrólise (WSSVp1) (5'-6FAM AGC CAT GAA GAA TGC CGT CTA TCA CAC A TAMRA-3'), 1  $\mu\text{L}$  (10-25 ng) de DNA e 3,25  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (Invitrogen®). Um controle negativo contendo todos os reagentes, exceto o DNA alvo e uma série de diluições do controle positivo pTOPO-WSSV equivalente a  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  e  $10^2$  cópias do WSSV foram adicionados a cada placa de qPCR.

Para a quantificação do número de cópias do WSSV foi empregada a plataforma 7500 *Real-time PCR system* (Applied Biosystems®). As condições de ciclagem foram as seguintes: incubação a 50°C por 2 min, seguido da ativação da Platinum®Taq DNA polymerase a 95 °C por 2 min, e 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 30 s a 60 °C. Os dados foram coletados durante a etapa de extensão final (60 °C). O número de cópias virais de cada amostra foi determinado de acordo com o *software* SDS 1.3.1 (Applied Biosystems®). Todas as amostras foram testadas em duplicata e somente consideradas positivas quando houve amplificação válida de ambas as réplicas.

### 3.7.4.2 Vírus da Mionecrose Infecçiosa (IMNV)

As reações de RT-qPCR foram realizadas em 10 µL de volume final contendo 5 µL de TaqMan Universal Master Mix (Invitrogen®), 0,3 µL (10 µM) de cada primer IMNV412F (5'-GGA CCT ATC ATA CAT AGC GTT TGC A-3') e IMNV545R (5'-AAC CCA TAT CTA TTG TCG CTG GAT-3'), 0,15 µL (10µM) da sonda de hidrólise (IMNVp1) (5'-6FAM CCA CCT TTA CTT TCA ATA CTA CAT CAT CCC CGG TAMRA-3'), 1 µL (10-25 ng) de cDNA e 3,25 µL de água ultrapura (Invitrogen®). Um controle negativo contendo todos os reagentes, exceto o cDNA alvo e uma série de diluições do controle positivo pTOPO-IMNV.1 equivalente a 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup> e 10<sup>2</sup> cópias do IMNV foram adicionados a cada placa de RT-qPCR. O controle positivo pTOPO-IMNV.1 consistiu de uma construção genética resultante da ligação de um amplicon de 593 pb do IMNV (Nº de acesso no GenBank: AY570982, nt 197-789) ao pCR® 2.1-TOPO vector (Invitrogen®).

Para a quantificação do número de cópias do IMNV foi empregada a plataforma 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems®). As condições de ciclagem foram as seguintes: incubação a 50 °C por 2 min, seguido da ativação da Platinum®Taq DNA polymerase a 95 °C por 2 min, e 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 30 s a 60 °C. Os dados foram coletados durante a etapa de extensão final (60 °C). O número de cópias virais de cada amostra foi determinado de acordo com o *software* SDS 1.3.1 (Applied Biosystems®). Todas as amostras foram testadas em duplicata e somente consideradas positivas quando da amplificação válida de ambas as réplicas.

### 3.7.4.3 Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)

As reações para pesquisa de IHHNV, por qPCR, foram realizadas em 10 µL de volume final contendo 5 µL de Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen®), 0,3 µL (10 µM) de cada primer IHHNV1608F (5'- TAC TCC GGA CAC CCA ACC A-3') e IHHNV1668R (5'- GGC TCT GGC AGC AAA GGT AA -3'), 0,1 µL de ROX, 1 µL (10-25 ng) de DNA e 3,3 µL de água ultrapura (Invitrogen®). As condições de ciclagem foram as seguintes: incubação a 50 °C por 2 min, seguido da ativação da Platinum®Taq DNA polymerase a 95 °C por 2 min, e 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 30 s a 60 °C. Os dados foram coletados durante a etapa de extensão final (60 °C). Após, a reação de amplificação, as amostras foram submetidas à análise da Temperatura de Melting, a fim de se verificar a curva de especificidade dos amplificadores gerados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Sobrevivência de metanúplios com diferentes alimentações

Os resultados das contagens de *Artemia* sp. em fase de metanúplio realizadas na câmara de Sedgwick Rafter, demonstraram diferenças na sobrevivência, de acordo com a alimentação utilizada. Ao final do experimento, a alimentação com a espécie de microalga *Nannochloropsis oculata* teve maior sobrevivência de indivíduos, sendo similar ao tratamento com *Tetraselmis gracilis*, porém esses dados não interferiram nas análises moleculares. Já no tratamento contendo *Chaetoceros muelleri*, houve maior mortalidade de metanúplio por mL (Tabela 1).

**Tabela 1** - Sobrevivência de metanúplios em diferentes alimentações.

Tratamentos com microalgas	metanúplio/mL		Mortalidade entre contagens	Sobrevivência por tratamento (%)
	contagem 1	contagem 2		
<i>Nannochloropsis oculata</i>	199	189	12	95
<i>Chaetoceros muelleri</i>	88	56	32	63,6
<i>Tetraselmis gracilis</i>	102	96	4	94,11
<i>Thalassiosira sp.</i>	107	92	15	86

Fonte: autor, 2023.

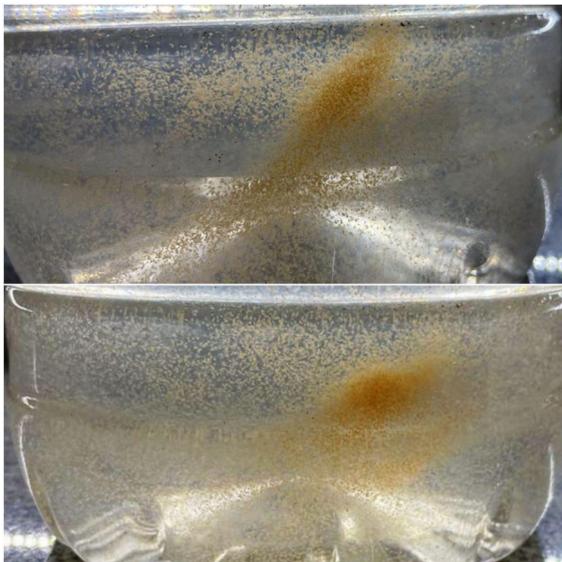
As microalgas são fontes alimentares de alto valor nutritivo, podendo agregar ou influenciar as porcentagem de proteínas, lipídios e carboidratos dos animais, no entanto, quando incorporadas em dietas de camarões elas podem ser fatores de risco, trazendo contaminantes ao cultivo. Camacho (2022) e Alejos (2021) enfatizaram a importância do alimento vivo isento de patógenos ou contaminantes para organismos aquáticos cultivados, reforçando medidas de biossegurança necessárias para minimizar riscos de contaminação e assegurar a qualidade e inocuidade do produto.

As *artêmias* em fase de metanáuplio obtiveram maior sobrevivência (porcentagem) e crescimento quando alimentadas com *Nannochloropsis oculata* e com *Tetraselmis gracilis*. Segundo Lora (2004), a quantidade de energia produzida em organismos alimentados com essa espécie de microalga, pode ser alocada para o crescimento ótimo ou esperado nos primeiros dias de regime alimentar, porém, a dieta não é ideal para longos cultivos de *Artemia* sp.

Os tratamentos que receberam alimentação de *Chaetoceros mueleri* apresentaram maior mortalidade (porcentagem) quando comparados aos demais cultivos, além disso os animais demonstraram comportamento de estresse, formando uma espécie de nuvem, aglomerando-se uns aos outros, os fatores podem estar relacionados a não absorção da microalga como alimento devido a sua forma retangular sendo dotadas de setas rígidas.

Ao longo do cultivo, a dieta alimentar contendo *Chaetoceros mueleri* pode apresentar diminuição da taxa de ingestão, devido a retenção no sistema digestivo dos animais. Experimentos de ecofisiologia também demonstraram que no decorrer do tempo o consumo de oxigênio aumentou drasticamente em sistemas alimentados com *Chaetoceros muelleri*, culminando em uma diminuição no ganho de peso e crescimento de *Artemia* sp. (LORA, 2004).

**Figura 14.** Comportamento de estresse dos organismos alimentados com *Chaetoceros mueleri*.



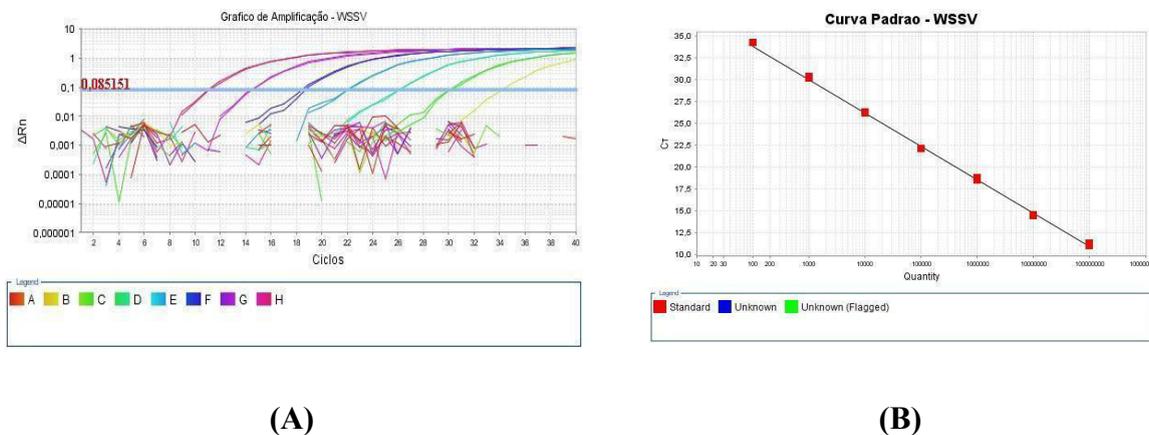
Fonte: Autor, 2023.

## 4.2 Investigação de patógenos virais

### 4.2.1 Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV)

A partir dos dados obtidos pela reação de qPCR, as amostras de investigação para WSSV indicaram que não houve presença do patógeno (Figura 14). Um estudo de patogenicidade revelou que o WSSV não foi capaz de infectar diferentes estágios de vida de *Artemia* por meio de exposição ao vírus e introdução oral (HAMEED, 2000). Apesar do resultado esperado, ainda não se conhece a forma como os alimentos vivos reagem ao WSSV fora de condições laboratoriais. Portanto, mais pesquisas precisam ser realizadas, podendo ser benéficas ao controle sanitário e minimização da incidência de patógenos virais. A suscetibilidade de *Artemia* sp. a WSSV foi testada por Li *et al.* (2003) em desafio experimental (sendo expostos ao vírus por via oral) e os dados demonstraram que houve transmissão vertical no decorrer dos estágios de vida do microcrustáceo.

**Figura 15.** Gráficos referentes à qPCR desenvolvida para análise do inóculo de WSSV utilizado no presente estudo. (A) Gráfico de amplificação e (B) Curva Padrão para WSSV.



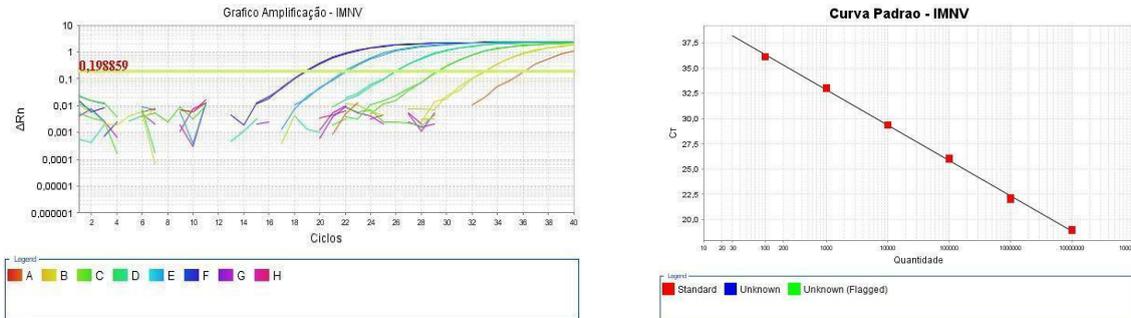
Fonte: Autor, 2023.

### 4.2.2 Vírus da Mionecrose Infecçiosa (IMNV)

As pesquisas por RT-qPCR revelaram que as amostras de investigação para IMNV não obtiveram resultados positivos, ou seja, alimentos vivos isentos do vírus (Figura 15). Em pesquisas de Feng *et al.* (2013) ocorreu a proliferação de vírus na membrana celular de *Artemia* sp., provando que o microcrustáceo pode ser reservatório de enfermidades. Além

disso, a atuação de *Artemia* como vetor de IMNV foi comprovada por Da Silva *et al.*, (2015), no qual a contaminação ocorreu por meio de transmissão horizontal.

**Figura 16.** Gráficos referentes à RT-qPCR desenvolvida para análise do inóculo de IMNV utilizado no presente estudo. (A) Gráfico de amplificação e (B) Curva Padrão para IMNV.



(A)

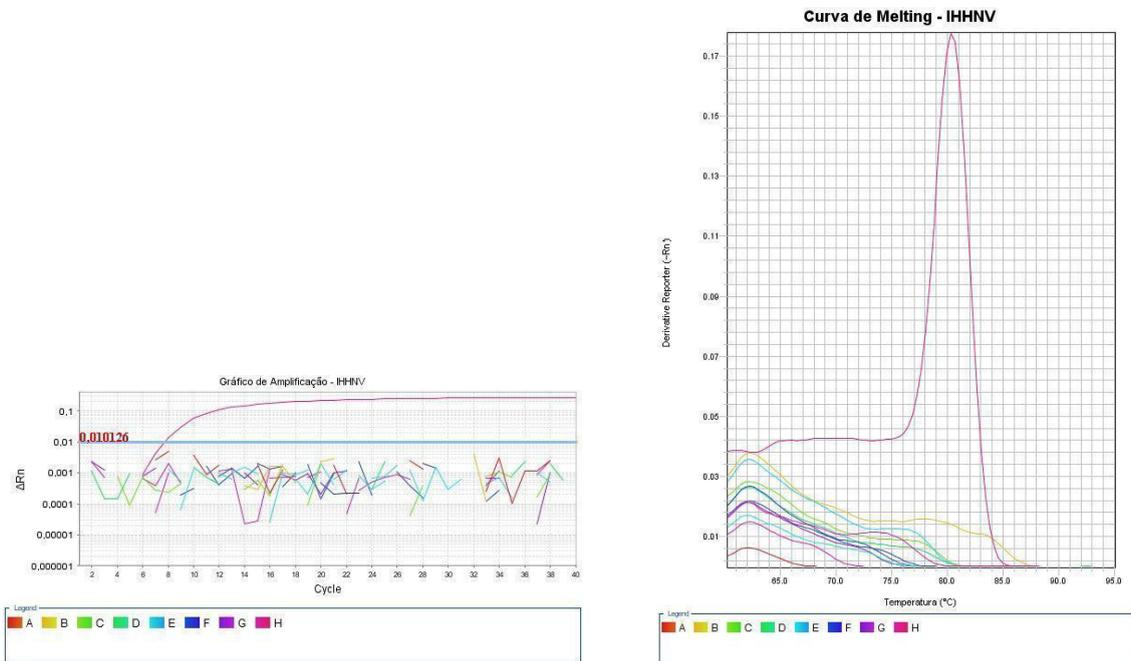
(B)

Fonte: Autores, 2023.

#### 4.2.3 Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV)

As reações para a pesquisa de IHHNV, por qPCR, revelaram que as amostras apresentaram resultado negativo, validando a ausência da enfermidade nas fontes de alimento vivo utilizadas (Figura 16). Apesar do resultado, estudos apontam que a investigação de IHHNV é de extrema importância pois ele é o menor dos vírus que ataca os camarões peneídeos, possui uma simetria icosaédrica, podendo ser facilmente levado ao trato digestório dos animais. Além disso, o estudo aponta que larvas e pós-larvas de camarão podem apresentar comportamento assintomático quando infectadas por IHHNV (COÊLHO, 2006). A curva padrão não foi utilizada para a investigação de IHHNV devido a utilização da sonda Sybr green.

**Figura 17.** Gráficos referentes à qPCR desenvolvida para análise do inóculo de IHNV utilizado no presente estudo. (A) Gráfico de amplificação e (B) Curva de Melting.



(A)

(B)

Fonte: Autor, 2023.

## 5 CONCLUSÃO

Foi possível concluir que o cultivo de *Artemia* sp. alimentada com as microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Tetraselmis gracilis* foram os mais vantajosos, devido à baixa mortalidade e maior contagem de *Artemia* sp. (tabela 1). O cultivo com regime alimentar de *Chaetoceros mueleri* demonstrou ser menos proveitoso para *Artemia* sp., possivelmente pelo consumo de oxigênio visto em trabalhos anteriores, ou pelo formato retangular com a estrutura composta por e setas rígidas, o que possivelmente dificultou a alimentação dos metanúplios de *Artemia* sp.

Sobre os estudos de sanidade, as investigações de patógenos virais em todas as amostras provaram que *Artemia* sp. alimentada com as microalgas das espécies *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros mueleri*, *Tetraselmis gracilis* e *Thalassiosira* sp., podem ser alimentos vivos isentos de enfermidades como os Vírus da Mancha branca (WSSV), Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) e Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV), devido sua condição sanitária positiva, como observado nos gráficos de amplificação. Portanto, a justificativa do trabalho foi correspondida, representando vantagem para a produção desses alimentos vivos, utilizando água marinha, quando em condições laboratoriais.

A partir dos resultados e comparativos com estudos anteriores, conclui-se que as triagens de alimentos vivos que adentram os cultivos devem ser realizadas rotineiramente, inclusive na obtenção dos alimentos vivos e seu manejo em laboratório, a fim de evitar a prevalência e incidência de patógenos virais que podem ser introduzidos por via oral em modelos de cultivo, visto que estes são fatores cruciais e determinantes na produção final e êxito da indústria camaroneira.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATZOPOULOS, Th J. *et al.* (ed.). **Artemia: basic and applied biology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002. *E-book*. ISBN 9789048160730.

ALEJOS CABRERA, Ruth. Manual de desinfección y esterilización del material de laboratorio de alimento vivo: microalgas. **Inf Inst Mar Perú**, v. 48, n. 1, 1 mar. 2021.

AVILA-VILLA, Luz Angélica *et al.* Evaluation of different microalgae species and Artemia (*Artemia franciscana*) as possible vectors of necrotizing hepatopancreatitis bacteria. **Aquaculture**, v. 318, n. 3-4, p. 273-276, ago. 2011. Acesso em: 3 dez. 2023.

BARBIERI JR, R. C.; OSTRENSKI-NETO, A. **Camarões Marinhos**. Viçosa: Aprenda Fácil. 2001.

BENGTSON, D.A.; Léger, P.; Sorgeloos, P. Use of Artemia as a food source for aquaculture. In: Browne, R.A., Sorgeloos, P., Trotman, C.N.A. (Eds.), **Artemia Biology**. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 255-285, 1991.

BEZERRA, Vera Lúcia de Assis. Acompanhamento das atividades no setor de microalgas do laboratório de larvicultura de Camarão *Litopenaeus vannamei* Sea Life Ltda., em Cajueiro da Praia, Piauí. 2008.

CAMACHO, Salazar; ALEXANDER, Diemenson. **Revisión sistemática y caracterización de microalgas incorporadas como alimento vivo en cultivos de especies bioacuáticas en Ecuador, 2010-2021**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena, 2022.

CÂMARA, Marcos Rogério; OLIVEIRA CAVALCANTE, Pedro Hercílio de. Embriões liofilizados e flocos de *Artemia* no cultivo pós-larval de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, n. 1, 28 mar. 2008. Acesso em: 15 dez. 2023.

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. de O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural. Brasil**, 40, nº 2, 339-347, 2010.

CHOI, M. *et al.* **Strain and dose infectivity of *Vibrio parahaemolyticus*: the causative agent of early mortality syndrome in shrimp**. *Aquaculture Research*, [s. l.], v. 48, p. 3719-3727, 2017.

COELHO, Maria das Graças Lima. **Susceptibilidade do camarão-rosa *Farfantepenaeus subtilis* (Perez-Farfante, 1967) ao vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHNV)**. 2006. reponame:Repositório Institucional da UFC, [s. l.], 2006. Acesso em: 3 dez. 2023.

COSTA, S. W. *et al.* Presença do vírus da síndrome da mancha branca em crustáceos decápodes silvestres em lagoas costeiras no Sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 209-216, fev. 2012. Acesso em: 3 dez. 2023.

DA SILVA, Suzianny Maria Bezerra Cabral *et al.* Artemia franciscana as a vector for infectious myonecrosis virus (IMNV) to Litopenaeus vannamei juvenile. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 126, p. 1-5, mar. 2015. Acesso em: 3 dez. 2023.

DESAFIOS E OPORTUNIDADES PARA A CARCINICULTURA BRASILEIRA: 2023-2030. **Revista da ABCC Edição FENACAM** – Ano XXIV N. 3 – Novembro de 2022.

DE NEGREIROS, Luiza Maria Saraiva; SANTOS, Daniele Bezerra. Doenças microbianas na carcinicultura brasileira: uma revisão. **Rev Cult Cienc UNIFACEX**, v. 13, p. 107-124, 2015.

DUERR, Eirik O.; MOLNAR, Agostinho; SATO, Vernon. Microalgas cultivadas como alimentos para aquicultura. **Journal of Marine Biotechnology**, v. 6, n. 2, pág. 0065-0070, 1998.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Aquaculture development** : supplement 6: use of wild fishery resources for capture-based aquaculture. [S. l.]: Food & Agriculture Organization of the United Nations, 2014. ISBN 9789255069741.

FEIJÓ, Rubens Galdino. Avaliação da variabilidade do vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (Ihnhv) no camarão rosa Farfantepenaeus subais (Pérez-Farfante, 1967) infectado experimentalmente. 2007.

FENG, Shuying *et al.* Binding of white spot syndrome virus to Artemia sp. cell membranes. **Journal of Virological Methods**, v. 193, n. 1, p. 108-111, out. 2013. Acesso em: 3 dez. 2023.

FLEGEL, T. W. Review of disease transmission risks from prawn products exported for human consumption. **Aquaculture**, v. 290, n. 3-4, p. 179-189, maio 2009. Acesso em: 3 dez. 2023.

Gandy, R.L.; Samocha, T.M.; Masser, M.P.; Fox, J.M.; Ali, S.A.M.; Gatlin, D.M.; Speed, M. The effect of unilateral eyestalk ablation and diet on the reproductive performance of wild-caught Farfantepenaeus aztecus (Ives, 1891) using a closed recirculating maturation system. **Aquac. Res.**, 38: 580-587, 2007.

JUNIOR, A. C. **Alimento inerte como alternativa para o cultivo de Artemia**. 2017. 27 f. Monografia (Graduação) – Curso Superior de Tecnologia em Aquicultura, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, 2017.

KALAGAYAN, Hector *et al.* IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome (RDS) of juvenile penaeus vannamei cultured in hawaii. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 22, n. 4, p. 235-243, dez. 1991. Acesso em: 3 dez. 2023.

LAVENS, P. e P. SORGELOOS. **Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper 361, 295 pp., 1996.

LI, Q. *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 57, p. 261-264, 2003. Acesso em: 3 dez. 2023.

LIGHTNER, Donald V. *et al.* Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of invertebrate pathology**, v. 110, n. 2, p. 174-183, 2012.

LORA VILCHIS, María Concepción. **Evaluación de la calidad dietética de microalgas mediante el estudio del balance energético de artemia franciscana**. 2004. Tese de doutorado — CENTRO DE PESQUISAS BIOLÓGICAS DO NOROESTE, Santa Catarina, 2004. Acesso em: 3 dez. 2023.

Lubián, L.M., Montero, O., Moreno-Garrido, I. *et al.* *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. **Journal of Applied Phycology** 12, 249–255 (2000). <https://doi.org/10.1023/A:1008170915932>.

MEJÍA, C. A. O., Mora, W. G. G., Cordero, P. Q., & López, L. J. Q. Efecto de la combinación de alimento artificial y biomasa de *Artemia sp* en cría intensiva de postlarvas de *litopenaeus vannamei*. **Dominio de las Ciencias**, 7(2), 1167-1189. 2021.

MELLO, Junior Carlos Cesar de. **Seleção de reprodutores de *Litopenaeus vannamei* livres da síndrome da mancha branca (WSSV), da necrose infecciosa hipodermal e hematopoiética (IHHNV) para produção de larvas livres destes patógenos virais**. 2012. Repositório Institucional da UFSC, 2012.

MOMOYAMA, Kazuo. Detection of white spot syndrome virus from small penaeid shrimp species caught in the western seto inland sea. **Fish Pathology**, v. 38, n. 3, p. 81-85, 2003. Acesso em: 3 dez. 2023.

MULLER-FEUGA, A. *et al.* Usos de microalgas na aquicultura. **Alimentação viva na aquicultura marinha**, v. 1, p. 253-299, 2003.

MUNTEANU, Constantin. *Artemia salina*. **Balneo-Research Journal**, v. 2, n. 4, 1 dez. 2011.

Naessens, E.; Lavens, P.; Gomez, L.; Browdy, C.L.; McGovern-Hopkins, K.; Spencer, A.W.; Kawahigashi, D.; Sorgeloos, P. Maturation performance of *Penaeus vannamei* co-fed *Artemia* biomass preparations. *Aquaculture*, 155: 87-101, 1997.

NUNAN, L. M.; POULOS, B. T.; LIGHTNER, D. V. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. **Aquaculture**, v. 160, n. 1-2, p. 19-30, jan. 1998. Acesso em: 3 dez. 2023.

PHELPS, R.; P. Recent advances in fish hatchery management. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 95-101, 2010.

PRINCÍPIOS integrados de zoologia. [S. l.]: Guanabara Koogan, 2004. ISBN 9788527708685.

SANTOS, Pedro Anderson de Paiva dos. **Caracterização de possíveis sítios polimórficos no vírus da mionecrose infecciosa (Imnv), patógeno do camarão *Litopenaeus Vannamei***. 2022. Repositório Institucional da UFC, 2022.

SCHMITZ, Roberta; MAGRO, Clinei Dal; COLLA, Luciane Maria. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, 18 ago. 2012. Acesso em: 3 dez. 2023.

SIQUEIRA, Ingrid Luana da Silveira. **Caracterização do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) prevalente no período de 2012, 2016 e 2018 no Município de Aracati (CE)**. 2019. Repositório Institucional da UFC, 2019.

SIVAKUMAR, V. K. *et al.* Experimental exposure of *Artemia* to Hepatopancreatic parvo-like Virus and Subsequent transmission to post-larvae of *Penaeus monodon*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, n. 3, p. 191-195, nov. 2009. Acesso em: 3 dez. 2023.

SORGELOOS, P. The use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), **The Brine Shrimp *Artemia***. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, vol. 3. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 25–45, 1980.

SORGELOOS, P.; DHERT, P.; CANDREVA, P. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. **Aquaculture**, v. 200, n. 1-2, p. 147-159, ago. 2001. Acesso em: 3 dez. 2023.

SÚ, J. F. I. **Alternativas para alimentação de *Artemia salina* sob condições de laboratório** 1986. 16 f. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 1986.

TAKATA, Rodrigo. **Produção de juvenis de *Artemia franciscana* e análise da utilização de dietas vivas e inertes na larvicultura intensiva do pintado *Pseudoplatystoma coruscans***. 2007. 117 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2007.

TORRES, GHE. **Comparação da *Nannochloropsis* sp e do farelo de soja para a produção de *Artemia* sp**. Universidade Federal do Paraná, 2017.

VÁSQUEZ SUÁREZ, Aleikar *et al.* Crecimiento y composición bioquímica de *Thalassiosira pseudonana* (Thalassiosirales: thalassiosiraceae) bajo cultivo semi-continuo en diferentes medios y niveles de irradiancias. **Revista de Biología Tropical**, v. 61, n. 3, 23 set. 2013. Acesso em: 3 dez. 2023.

ZHANG, Jia-Song *et al.* Assessment of the role of brine shrimp *Artemia* in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. **Veterinary Research Communications**, v. 34, n. 1, p. 25-32, 19 dez. 2009. Acesso em: 3 dez. 2023.