



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

JULIANA OLIVEIRA DE FREITAS

DESEMPENHO REPRODUTIVO E EXPRESSÃO DE GENES EM FÊMEAS DE
Penaeus vannamei* (Boone, 1931) ALIMENTADAS COM ÓLEO DE *Cocos nucifera
(Linnaeus, 1753) COMO ADITIVO ALIMENTAR

FORTALEZA

2024

JULIANA OLIVEIRA DE FREITAS

DESEMPENHO REPRODUTIVO E EXPRESSÃO DE GENES EM FÊMEAS DE *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) ALIMENTADAS COM ÓLEO DE *Cocos nucifera* (Linnaeus, 1753) COMO ADITIVO ALIMENTAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, do Departamento de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e genética de organismos aquáticos.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.
Coorientador: Dr. Rafael dos Santos Rocha.

FORTALEZA

2024

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)

- F936d Freitas, Juliana Oliveira de.
Desempenho reprodutivo e expressão de genes em fêmeas de *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) alimentadas com óleo de *Cocos nucifera* (Linnaeus, 1753) como aditivo alimentar / Juliana Oliveira de Freitas. – 2024.
119 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maggioni.
Coorientação: Prof. Dr. Rafael dos Santos Rocha.
1. Camarão branco. 2. Óleo de coco. 3. Reprodução. 4. Histologia. 5. Expressão gênica. I. Título.
CDD 639.2
-

JULIANA OLIVEIRA DE FREITAS

DESEMPENHO REPRODUTIVO E EXPRESSÃO DE GENES EM FÊMEAS DE *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) ALIMENTADAS COM ÓLEO DE *Cocos nucifera* (Linnaeus, 1753) COMO ADITIVO ALIMENTAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, do Departamento de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Biotecnologia e genética de organismos aquáticos.

Aprovado em: 03/06/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Maggioni (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. Luis Otavio Brito da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. Rubens Galdino Feijó
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Dr. Luiz Fagner Ferreira Nogueira
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

A Deus, à Virgem Maria e a São José.

A minha família, em especial meus pais Maria Carmosa e José Nilton.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu cuidado, proteção, bondade, amor e misericórdia. Sem Ele eu nada seria e teria. DEle provém toda a força, inspiração, coragem e fé de que tudo dará certo.

Aos meus santos de devoção e amigos do céu: Nossa Senhora de Fátima, São Miguel Arcanjo, São José, São Padre Pio, São Bento e ao meu Anjo da Guarda.

A minha família, Maria Carmosa, José Nilton e Mariane Maria, por acreditarem em mim, por todas as orações, pelo amor incondicional, apoio emocional, por serem minha base forte e motivos para lutar. Obrigada por todo o incentivo, motivação e por serem repouso, aconchego e certeza de que sempre terei para onde voltar e com quem contar em todos os momentos.

A Fernanda, Tia Mônica e Hadassa por serem apoio, abrigo e família nessa cidade, nessa trajetória e sempre que eu preciso.

Aos colegas do laboratório, que se tornaram amigos, pessoas tão especiais que fizeram com que essa jornada fosse mais alegre, menos pesada e mais suportável. Sou grata por tudo, por todos os momentos, sufocos, alegrias, ajudas na bancada, lamentos, risos e cafés compartilhados. Jhonatas Teixeira, Ingrid Siqueira, Vilany Menezes, Cibelle Monteiro e Hudson Damasceno.

A Graça Coelho por toda ajuda na histologia e também por ter me acolhido tão bem no laboratório e me ter oferecido abrigo quando precisei.

Ao meu orientador, professor Dr. Rodrigo Maggioni. Gratidão pela confiança em aceitar me orientar nessa jornada, pela forma leve como conduz a orientação. Obrigada por toda contribuição e por acreditar em mim e no meu trabalho.

Ao meu coorientador Dr. Rafael dos Santos Rocha, a quem não tenho nem palavras para expressar minha gratidão por tudo o que fez por mim nessa etapa difícil e importante da minha formação profissional e acadêmica. Por todas as vezes que você excedeu suas horas diárias e ficou até tarde da noite me ajudando nas extrações, expressões, análises e estatísticas. Por todo o apoio e ajuda, muita gratidão.

Ao Jhonatas Teixeira, meu coorientador extra não registrado em papel, mas que também não tenho como mensurar sua importância e contribuições na realização desse trabalho, e nos que ainda estão por vir. Obrigada por sempre estar disposto a ajudar, ouvir e me encorajar. Suas palavras e ajudas fizeram toda diferença.

Aos membros da banca de qualificação (Prof.^a Dra. Sandra Salmito e a Prof.^a Dra. Isabela Moraes) e da banca de defesa (Profa. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra, Prof. Dr. Luis

Otavio Brito da Silva, Prof. Dr. Rubens Galdino Feijó e Dr. Luiz Fagner Ferreira Nogueira) que dispuseram de seu empenho, tempo e atenção em contribuir na avaliação e melhoria deste trabalho.

A empresa Aquacrusta Marinha, na pessoa do Sr. Livino Sales, pelo acolhimento e portas abertas que encontrei desde a idealização do projeto, realização e conclusão. Por ter disponibilizado toda a estrutura, animais, insumos para a produção e apoio técnico de seus colaboradores.

Ao Eliezio Cabral, responsável pelo setor de maturação, por estar sempre disposto a colaborar. Pela paciência antes, durante e depois da realização do experimento. Pelo compartilhamento do conhecimento, por tudo.

A todos que estiverem e estão comigo nessa fase tão importante e significativa para mim. Meu muito obrigada.

A Universidade Federal do Ceará, pelo compromisso em ofertar educação de qualidade.

Ao laboratório CEDECAM, que foi minha casa por seis anos, onde pude aprender tantas coisas que levarei para a vida, pessoal e profissional. Muita gratidão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“É justo que muito custe aquilo que muito vale.” (Santa Teresa D’Ávila).

RESUMO

O camarão marinho *Penaeus vannamei* é a espécie de crustáceo mais cultivada globalmente. A reprodução de camarões marinhos em cativeiro ocorre em laboratórios especializados, e nessa etapa, os fatores nutricionais desempenham um papel crucial no desenvolvimento gonadal, fertilidade e qualidade das proles dos reprodutores de camarões. Por essa razão, os mesmos são mantidos sob um regime alimentar diferenciado. Diante do aumento das necessidades por lipídios na fase reprodutiva, a utilização de óleos de origem vegetal como aditivo alimentar incorporado à ração configura-se como uma alternativa. O presente estudo se dispôs a avaliar o desempenho reprodutivo e expressão de genes em fêmeas de *P. vannamei* alimentadas com dieta utilizando óleo de coco como aditivo. Para tal, um experimento com duração de três meses foi conduzido no setor de maturação de uma empresa produtora de camarão. Um total de 840 animais foi dividido em seis tanques, que compuseram dois tratamentos: controle e óleo. Cada tratamento possuía 420 animais, distribuídos em três tanques, nos quais foram formadas famílias, com 70 machos e 70 fêmeas por tanque. Os camarões foram alimentados diariamente com lula, marisco e ração, diferindo do tratamento com óleo para o controle apenas a adição do óleo de coco (*Cocos nucifera*) à ração, na concentração de 2,5%. A partir dos dados de desempenho reprodutivo coletados diariamente, constatou-se que, com exceção do número de ovos diários e abortos, que não diferiram entre os tratamentos, em todos os outros parâmetros analisados (taxas de cópulas, desovas, eclosões, número de náuplios), as fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco apresentaram valores superiores ao controle. Quanto aos índices hepatossomáticos, não foram registradas diferenças significativas. Nos índices gonadossomáticos, apenas no segundo mês em produção, o índice foi maior para as fêmeas do grupo alimentado com ração suplementada com óleo de coco. A contagem total de hemócitos no tratamento com óleo foi 1,7 vezes maior que no controle. As análises histológicas das gônadas revelaram uma porcentagem 1,3 vezes maior de fêmeas maduras ou em maturação quando alimentadas com dieta suplementada com óleo de coco. Com relação aos outros tecidos analisados (intestino e hepatopâncreas), não foram notadas diferenças significativas. Dentre os genes analisados (*Hsp70*, *proPO*, *SOD*, *Lipase*, *Tripsina*, *vtg*, *vtgr*, *mprg*), com exceção da *lipase*, que não foi detectada nos ovários, e o *receptor de vitelogenina* que não diferiu no mesmo tecido, todos os demais foram regulados pela suplementação com óleo de coco. Os resultados obtidos confirmam a hipótese de que o óleo de coco adicionado à ração fornecida às fêmeas reprodutoras de *P. vannamei* confere benefícios relacionados à reprodução, favorecendo o

desenvolvimento gonadal e resultando em maior número de náuplios. Foi registrado ainda maior ganho de peso nos animais alimentados com ração suplementada com óleo de coco.

Palavras-chave: camarão branco; óleo de coco; reprodução; histologia; expressão gênica.

ABSTRACT

The marine shrimp *Penaeus vannamei* is the most cultivated crustacean species globally. The reproduction of marine shrimp in captivity takes place in specialized laboratories, and at this stage, nutritional factors play a crucial role in the gonadal development, fertility and quality of the offspring of shrimp breeders. For this reason, they are kept on a different diet. Given the increased needs for lipids in the reproductive phase, the use of oils of vegetable origin as a food additive incorporated into the feed represents an alternative. The present study set out to evaluate the reproductive performance and gene expression in *P. vannamei* females fed a diet using coconut oil as an additive. To this end, a three-month experiment was conducted in the maturation sector of a shrimp producing company. A total of 840 animals were divided into six tanks, which comprised two treatments: control and oil. Each treatment had 420 animals, distributed in three tanks, in which families were formed, with 70 males and 70 females per tank. The shrimp were fed daily with squid, shellfish and food, differing from the oil treatment for the control only by adding coconut oil (*Cocos nucifera*) to the food, at a concentration of 2.5%. From the reproductive performance data collected daily, it was found that, with the exception of the number of daily eggs and abortions, which did not differ between treatments, in all other parameters analyzed (copulation rates, spawning, hatchings, number of nauplii), females fed diet supplemented with coconut oil showed higher values than the control. Regarding hepatosomatic indices, no significant differences were recorded. In terms of gonadosomatic indexes, only in the second month of production, the index was higher for females in the group fed with food supplemented with coconut oil. The total hemocyte count in the oil treatment was 1.7 times higher than in the control. Histological analysis of the gonads revealed a 1.3 times higher percentage of mature or maturing females when fed a diet supplemented with coconut oil. Regarding the other tissues analyzed (intestine and hepatopancreas), no significant differences were noted. Among the genes analyzed (*Hsp70*, *proPO*, *SOD*, *Lipase*, *Trypsin*, *vtg*, *vtgr*, *mprg*), with the exception of lipase, which was not detected in the ovaries, and the vitellogenin receptor, which did not differ in the same tissue, all the others were regulated by coconut oil supplementation. The results obtained confirm the hypothesis that coconut oil added to the feed supplied to breeding females of *P. vannamei* confers benefits related to reproduction, favoring gonadal development and resulting in a greater number of nauplii. Even greater weight gain was recorded in animals fed food supplemented with coconut oil.

Keywords: white shrimp; coconut oil; reproduction; histology; gene expression.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Carcinicultura	15
2.2	<i>P. vannamei</i> e aspectos reprodutivos	16
2.2.1	<i>Anatomia e aparatos reprodutores</i>	16
2.2.2	<i>Ciclo de vida de P. vannamei</i>	19
2.2.3	<i>Reprodução em cativeiro</i>	20
2.2.3	<i>Estágios de maturação gonadal</i>	22
2.3	Biotecnologias e expressão gênica na carcinicultura	24
2.4	Nutrição de camarões peneídeos	28
2.4.1	<i>Exigências nutricionais na fase reprodutiva</i>	29
2.5	Óleo de coco como fonte de lipídios	30
3	OBJETIVOS	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Obtenção dos animais e aclimação	35
4.2	Dietas e delineamento experimental	35
4.3	Coletas	40
4.4	Desempenho reprodutivo	41
4.4.1	<i>Taxa de cópula</i>	41
4.4.2	<i>Taxa de desovas</i>	42
4.4.3	<i>Abortos</i>	42
4.4.4	<i>Número de ovos</i>	43
4.4.5	<i>Taxa de eclosão e número de náuplios</i>	43
4.5	Análises macroscópicas, somáticas e histológicas	45
4.5.1	<i>Índices gonadossomático e hepatossomático</i>	45
4.5.2	<i>Análises histológicas</i>	46
4.6	Contagem total de hemócitos	48
4.7	Ganho de peso	49
4.8	Expressão de genes	48
4.9	Análises estatísticas	51
4.9.1	<i>Desempenho reprodutivo</i>	51
4.9.2	<i>Contagem de Hemócitos, IGS IHS</i>	52
4.9.3	<i>Ganho de peso</i>	52
4.9.4	<i>Expressão Gênica</i>	52
5	RESULTADOS	52
5.1	Desempenho reprodutivo	52
5.1.1	<i>Taxa de cópula</i>	52
5.1.2	<i>Número de abortos</i>	53
5.1.3	<i>Taxa de desovas</i>	54

5.1.3.1	<i>Quantidade de desovas por fêmea</i>	55
5.1.4	<i>Número de ovos</i>	57
5.1.5	<i>Taxa de eclosão</i>	57
5.1.6	<i>Número de náuplios</i>	58
5.2	Análises macroscópicas e histológicas das gônadas	59
5.2.1	<i>Análises macroscópicas</i>	59
5.2.1.1	<i>Índices gonadossomático e hepatossomático</i>	62
5.2.2	<i>Análises histológicas das gônadas</i>	64
5.3	Análises histológicas do hepatopâncreas e intestino	68
5.4	Contagem total de hemócitos	71
5.5	Ganho de peso	72
5.6	Expressão gênica	73
5.6.1	<i>Expressão de genes relacionados à imunidade</i>	73
5.6.2	<i>Expressão de genes relacionados à nutrição</i>	75
5.6.3	<i>Expressão de genes relacionados à maturação/reprodução</i>	76
5.7	Desempenho geral	78
6	DISCUSSÃO	80
6.1	Desempenho reprodutivo	80
6.1.1	<i>Taxa de cópulas</i>	80
6.1.2	<i>Número de abortos</i>	81
6.1.3	<i>Taxa de desovas</i>	82
6.1.3.1	<i>Quantidade de desovas por fêmea</i>	83
6.1.4	<i>Número de ovos</i>	85
6.1.5	<i>Taxa de eclosão</i>	86
6.1.6	<i>Número de náuplios</i>	87
6.2	Análises macroscópicas e histológicas das gônadas	88
6.2.1	<i>Análises macroscópicas</i>	88
6.2.1.1	<i>Índices gonadossomático e hepatossomático</i>	89
6.2.2	<i>Análises histológicas das gônadas</i>	90
6.3	Análises histológicas do hepatopâncreas e intestino	91
6.4	Contagem total de hemócitos	92
6.5	Ganho de peso	93
6.6	Expressão gênica	94
6.6.1	<i>Expressão de genes relacionados à imunidade</i>	94
6.6.2	<i>Expressão de genes relacionados à nutrição</i>	95
6.6.3	<i>Expressão de genes relacionados à maturação/reprodução</i>	96
6.7	Desempenho geral	99
7	CONCLUSÃO	102
	REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura, atividade de cultivo de organismos aquáticos, contribui fortemente para a produção de alimentos e geração de empregos e renda. Apresenta crescimento notório, sendo uma importante contribuinte para a garantia da segurança alimentar e fornecimento de proteína de origem animal de qualidade, a nível global (FAO, 2024).

Dentre os setores da aquicultura que mais crescem está a carcinicultura. O cultivo mundial de camarões tem como principal espécie cultivada o *Penaeus vannamei* (Boone, 1931), com 5,8 milhões de toneladas produzidas em 2020, respondendo por 51,7% da produção total de crustáceos. No Brasil, a região Nordeste é a maior produtora, responsável por 99,6% do camarão cultivado no país em 2020. Essa grande representatividade se dá devido à numerosa quantidade de empreendimentos instalados na região, que possui características climáticas favoráveis, como temperatura elevada e curto período de chuvas, que tornam propícia à grande produtividade do camarão. Os estados do Rio Grande do Norte e Ceará concentram a maior parte desta produção (FAO, 2022; VIDAL, 2022).

O ciclo produtivo do camarão cultivado é dividido em três fases principais: reprodução, larvicultura e engorda (ALFARO-MONTOYA; BRAGA; UMAÑA-CASTRO, 2019). A reprodução ocorre em laboratórios especializados contendo setor de aclimatação, cópula, desova, eclosão e expedição de náuplios. No setor de maturação são formadas as famílias, onde machos e fêmeas são mantidos juntos em um mesmo tanque para que ocorra o acasalamento. As fêmeas copuladas são transferidas para tanques onde desovam, e a seguir retornam aos tanques de origem, onde recuperam-se e voltam à produção (BARBIERI-JUNIOR; OSTRENSKY, 2001).

Nesta fase, a nutrição desses animais tem um importante papel em seus processos reprodutivos, principalmente relacionados aos níveis de lipídios totais e específicos da dieta. Há relatos de que, durante a reprodução, o conteúdo de lipídios diminui no hepatopâncreas e é transferido para o ovário na maturação dos ovócitos, que é, portanto, diretamente influenciada pelo nível de lipídios contido na dieta (WOUTERS *et al.*, 2001; GLENCROSS, 2009).

Diante do aumento das necessidades por lipídios na fase reprodutiva, e da escassez e elevado custo de óleos de origem animal para formulação de dietas, a utilização de óleos de origem vegetal como aditivo alimentar incorporado à ração configura-se como uma alternativa sustentável, considerando que muitos destes óleos são mais acessíveis, abundantes e localmente disponíveis quando comparados a óleos de origem animal. Alguns óleos vegetais já tiveram sua

eficácia comprovada na melhora do desempenho zootécnico e reprodutivo de organismos aquáticos. Em estudo realizado por Sousa (2017) utilizando óleo de coco como aditivo alimentar na dieta de *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862), ocorreu maior ganho de peso, maior vacuolização das células B na glândula digestiva e maior quantidade de oócitos nas fêmeas alimentadas com essa dieta.

Desse modo, o presente estudo busca avaliar através do acompanhamento de parâmetros reprodutivos, análises histológicas e expressão gênica, o efeito da adição de óleo de coco à ração comercial da dieta de fêmeas de *P. vannamei*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Carcinicultura

A carcinicultura é uma das atividades que mais contribuiu para o desenvolvimento da aquicultura mundial nos últimos anos. De acordo com os dados do relatório mais recente da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) (2024), a produção mundial de pesca e aquicultura atingiu um recorde na produção aquícola de animais aquáticos, superando a captura. A produção mundial de pesca e aquicultura em 2022 elevou-se a 223,2 milhões de toneladas, 4,4% a mais que em 2020.

O nordeste brasileiro concentra a maior produção de camarões no país. A região foi responsável por 99,6% do camarão cultivado no país em 2020, com a maior produção concentrando-se nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará, e se expandindo pelos demais estados e também em águas interiores de baixa salinidade (VIDAL, 2022). No Brasil, o cultivo de camarão teve início nos anos 70 com espécies nativas, mas só a partir de 80, com aumento em investimentos no setor e com a introdução de espécies exóticas, a atividade teve maior impulso (NORÕES, 2017). Na década de 90, a introdução da espécie *P. vannamei* e a ampliação das áreas de produção em vários estados, em especial na região Nordeste marcaram o início do sucesso da carcinicultura brasileira (RODRIGUES; BORBA, 2013).

O desenvolvimento de pacotes tecnológicos, melhoramento genético, formação de profissionais na área, elaboração de dietas cada vez mais completas, aperfeiçoamento das práticas de manejo, reutilização de água, utilização de probióticos, adoção da tecnologia de bioflocos, simbióticos, implemento de técnicas para ampliar a rentabilidade e produtividade tiveram e continuam tendo um importante papel na intensificação da carcinicultura no país (LEITÃO *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2015).

A implantação desses pacotes tecnológicos possibilita o crescimento da carcinicultura e em contrapartida aumenta também os custos de produção, o que atualmente é uma das principais preocupações do setor. Um dos maiores custos de produção é referente à ração, visto que seu preço final é diretamente proporcional ao preço da soja, do milho e do trigo, que vêm apresentando aumentos constantes. Outra problemática relevante é a manifestação de enfermidades que acometem os cultivos e causam perdas expressivas quando ocorrem. Isso requer dos produtores a adoção de estratégias de prevenção e biossegurança aliadas ao melhoramento genético e nutrição a fim de reduzir perdas econômicas ocasionadas pelas enfermidades (KUBITZA, 2015; FAO, 2020).

Mesmo diante dos problemas enfrentados na atividade, há perspectivas de crescimento da carcinicultura brasileira, visto que há uma crescente demanda mundial por camarão, que deve ser atendida pela aquicultura, já que os estoques naturais continuam sendo superexplorados e encontram-se em declínio. A expansão dos cultivos de camarão em águas interiores também favorece esse crescimento, junto com a aplicação de investimentos em pesquisa e tecnologia, que são indispensáveis para a intensificação e fortalecimento da carcinicultura de forma sustentável, com alta produtividade e rentabilidade (VIDAL, 2022).

2.2 *P. vannamei* e aspectos reprodutivos

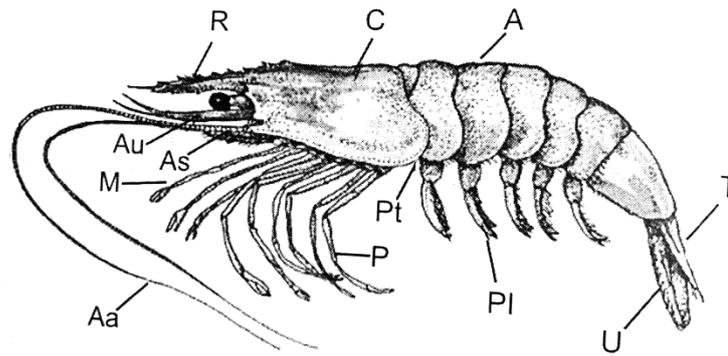
O camarão branco ou camarão cinza, como também é conhecido no Brasil, *P. vannamei*, é um crustáceo pertencente à ordem Decapoda e família Penaeidae. É uma espécie nativa da costa oriental do Oceano Pacífico, distribuída desde o Peru até o México, mas introduzida com sucesso em diversos países. Apresenta alta produtividade, que se dá principalmente devido às suas características zootécnicas favoráveis ao cultivo, como rusticidade, crescimento acelerado, conversão alimentar eficiente, tolerância a amplas e rápidas flutuações de salinidade e capacidade de adaptação (COZER; ROSSI, 2016).

Segundo dados da FAO (2022), *P. vannamei* foi a espécie animal da carcinicultura mais cultivada mundialmente em 2020, com 5,8 milhões de toneladas produzidas, o que equivale a 51,7% da produção total de crustáceos.

2.2.1 Anatomia e aparatos reprodutores

Camarões peneídeos possuem corpo achatado lateralmente e alongado, coberto por um exoesqueleto calcificado, a carapaça. Seu corpo é segmentado, dividido em três regiões: a cabeça (*céfalon*), o tórax (*péreiion*) e o abdômen (*pléon*). Essas regiões são compostas por somitos, onde estão inseridos os apêndices do camarão (Figura 1).

Figura 1 – Vista lateral da anatomia externa de um camarão peneídeo macho (A, abdômen; Aa, antena; As, escama antenal; Au, antênula; C, carapaça; M, terceiro maxilípide; P, pereiópode (pata usada para caminhar) Pl, pleópodo (pata usada para nadar); Pt, petasma; R, rostro; I, telson; U, urópodo).



Fonte: BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001.

A cabeça e o tórax são fusionados formando o cefalotórax, localizado na região anterior, onde três estruturas se destacam: a) a carapaça, uma fusão de seis somitos cefálicos e oito torácicos, que cobre as brânquias e outros órgãos vitais; b) os olhos pedunculados; c) o rostrum, que se assemelha a uma sequência de espinhos e atua como estrutura de defesa contra predadores. A porção posterior do corpo é o abdômen, que vai desde o final do cefalotórax até a porção terminal do animal, onde fica o telson. O abdômen possui seis segmentos e nele é concentrada a maior parte da musculatura dos camarões. Nas regiões anterior e posterior estão distribuídos apêndices que realizam diversas funções, como locomoção, alimentação, escavação, limpeza das brânquias e funções sensoriais (Figura 1) (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001).

Os camarões peneídeos possuem dimorfismo sexual. Normalmente os machos atingem a maturidade sexual no tamanho médio de 17 cm e peso aproximado de 20 g, enquanto as fêmeas começam a maturar a partir de 23 cm e peso médio de 28 g, ambos após 6-7 meses de vida (COZER; ROSSI, 2016).

As estruturas morfológicas externas que definem o sexo nesses animais é o téllico em fêmeas e o petasma em machos (Figura 2). O téllico é a área genital das fêmeas de peneídeos, relacionada com a fixação e/ou estocagem de espermátóforos, localizado na região póstero-ventral do cefalotórax, entre o quarto e quinto par de pereiópodos. Pérez-Farfante (1975) agrupou os peneídeos em duas categorias quanto ao tipo de téllico, que pode ser aberto ou fechado. Nas espécies de téllico fechado, as placas esternais são modificadas, se enrijecem após a muda, formando os receptáculos seminais, onde os espermátóforos são depositados. Nas fêmeas de téllico aberto, que é o caso da espécie *P. vannamei*, as placas esternais não formam os receptáculos, sendo modificadas formando depressões abertas.

O petasma é o órgão copulador dos machos e consiste em um par de endopoditos aumentados do primeiro par de pleópodos, que se unem através do encaixe de minúsculas

estruturas em forma de ganchos encontradas na face medial de cada endopodito. Sua função está relacionada com a inseminação, na transferência dos espermatozoides para o téglico das fêmeas (Pérez-Farfante; Kensley 1997).

Figura 2 – Fêmea (esquerda) com círculo azul mostrando o téglico aberto; macho (direita) com círculo vermelho indicando o petasma e amarelo realçando os espermatozoides de *P. vannamei*.



Fonte: Elaborada pela autora.

Em ambos, o sistema reprodutivo localiza-se na região médio ventral do hepatopâncreas. Machos possuem ainda um par de testículos, vasos deferentes, ampolas terminais e o petasma, que é o aparelho copulador. Já as fêmeas possuem um par de ovários, ovidutos e um téglico, aberto na espécie *P. vannamei*, localizado na parte ventral, composto por placas receptoras dos espermatozoides. O ovário é composto por lóbulos e ocupa grande parte do corpo (Figura 3) (ANDREATA; BELTRAME, 2004).

Figura 3 – Fêmea maturada com setas azuis indicando o ovário.



Fonte: Elaborada pela autora.

2.2.2 Ciclo de vida de *P. vannamei*

Em seu ambiente natural, camarões peneídeos geralmente acasalam e desovam em mar aberto, em zonas profundas, e os ovos são liberados no período noturno, o que provavelmente é um mecanismo para minimizar a ação de predadores. A fecundação é externa, portanto os ovócitos são fecundados apenas no momento da sua liberação, onde as fêmeas passam a nadar rapidamente, liberando os ovos e com o movimento dos pleópodos facilitando o contato entre ovócitos e espermatozoides. Por volta de 12 horas após a fecundação, ocorre a eclosão dos ovos e nascem os náuplios, que são planctônicos. Nesse estágio, utilizam apenas suas reservas de vitelo para se nutrir. No estágio seguinte, denominado protozoa, os animais atraídos pela luz migram para as camadas superiores do mar, onde alimentam-se de fitoplâncton. Após passarem por nova muda, onde a carapaça recobre o tórax do animal, as larvas são chamadas de mísis e além de fitoplâncton, começam a alimentar-se também de zooplâncton, sendo capazes de os perseguir para ingeri-los (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001).

Finalizada a fase larval, é considerado uma pós-larva, e apresenta todos os apêndices vistos em um camarão adulto. Nessa fase o animal passa de planctônico a bentônico,

abandonando o ambiente tipicamente marinho para terminar o seu desenvolvimento em zonas estuarinas. Os camarões juvenis crescem no ambiente estuarino, onde alimentam-se de detritos, vegetais e pequenos invertebrados, e conforme aproximam-se da maturidade sexual, retornam para o mar aberto, onde acontece a sua maturação, reprodução e desova (VALLES-JIMENEZ; CRUZ; PEREZ-ENRIQUEZ *et al.*, 2005).

2.2.3 Reprodução em cativeiro

Para que a carcinicultura se consolidasse no Brasil foi necessário que o país dominasse as técnicas de reprodução e produzisse suas próprias larvas, visto que seria inviável manter-se importando ou capturando do ambiente. Para que isso ocorresse, nos anos 90 foram adquiridos reprodutores de países como Equador, Colômbia e México, e assim o país passou a produzir suas pós-larvas, dando início à distribuição comercial e intensificando as atividades nas fazendas de cultivo (LIMA, 2007; FURTADO NETO, 2014).

Para a formação de plantel de reprodutores, animais criados em viveiros são selecionados e transportados para o laboratório, onde são transferidos para tanques de aclimação com taxa de renovação diária de água mantida em torno de 150% e taxa de alimentação aproximada de 12% da biomassa/dia, numa densidade recomendada de quatro a seis reprodutores por m² (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001).

Após aclimação, antes da transferência para os tanques de produção, em setores de maturação que trabalham com ablação, é realizado esse procedimento. O mesmo consiste na retirada do pedúnculo ocular com intuito de induzir e acelerar a maturação sexual das fêmeas. O pedúnculo ocular dos crustáceos abriga células neuro-secretoras que formam o complexo órgão-X/glândula do seio, responsável pela produção, estocagem e distribuição de hormônios reguladores da muda e gametogênese. Esse processo está intrinsecamente ligado ao controle da reprodução, visto que a remoção deste órgão favorece o desenvolvimento das gônadas (ALFARO-MONTOYA; BRAGA; UMAÑA-CASTRO, 2019).

Com a retirada do pedúnculo ocular, que abriga o órgão-X, responsável pela síntese do Hormônio Inibidor Gonadal (GIH), a produção deste hormônio é reduzida, possibilitando maior concentração do Hormônio Estimulador Gonadal, produzido pelo órgão-Y no cefalotórax, que por sua vez estimula a maturação gonadal (LIMA *et al.*, 2015).

A ablação pode ser realizada de várias formas, dentre elas: corte com uma lâmina no globo ocular retirando todo material interno do olho; esmagamento da base do pedúnculo com alicate ou extirpação com uma tesoura na base do pedúnculo (BARBIERI JUNIOR;

OSTRENSKY NETO, 2001), ou pode ainda ser feito através da amarração de uma linha na base do pedúnculo ocular, fazendo com o que a circulação para o olho seja interrompida, vindo a cair posteriormente.

Apesar do efeito de acelerar a maturação nas fêmeas, a ablação apresenta desvantagens para os animais. Dentre elas, podem ser citadas: estresse e perturbação de seu bem-estar, desequilíbrio fisiológico, comprometimento das defesas imunológicas, esgotamento acelerado da reprodução e o aumento da mortalidade dos reprodutores (BAE *et al.*, 2013; DAS *et al.*, 2015). Menezes (2019) e Zacarias *et al.* (2019) testaram e compararam o desempenho reprodutivo de fêmeas abladadas e não abladadas. O primeiro notou desempenho similar entre os grupos, e o segundo obteve desempenho superior nas fêmeas não abladadas.

Aproximadamente quatro dias após a ablação, as fêmeas começam a apresentar aspectos de maturação de suas gônadas, visíveis na região dorsal. A partir daí são formadas as famílias de reprodutores, na proporção de 1:1 (um macho para uma fêmea). Normalmente esses reprodutores permanecem em produção por três a quatro meses, sendo substituídos após esse período (ROCHA, 2007).

Diariamente é realizada checagem nos tanques de produção para identificação das fêmeas que são copuladas, candidatas a desovarem. Essas apresentam o espermátóforo fresco depositado em seu téllico (Figura 4), ovários desenvolvidos, visualizados através da observação do exoesqueleto translúcido. Constatadas essas características, as fêmeas são transferidas para tanques de desova, onde liberam seus ovos, e em seguida retornam a seus tanques de origem. Os ovos são drenados e lavados com fluxo intenso e contínuo de água e em seguida transferidos para *carboys*/tanques de eclosão. Passadas 12-14 horas começam a nascer os primeiros náuplios, que tendem a concentrar-se abaixo de uma luz fixada acima do *carboy*, devido sua fototaxia positiva. Os náuplios em estágio II-III são transferidos para lavadores, separando-os dos ovos que não eclodiram. A seguir são transferidos para tanques em laboratórios de larvicultura, onde permanecem até atingirem o estágio de pós larvas, quando são transferidos para berçários, viveiros de engorda ou comercializadas (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001; ROCHA, 2007).

Figura 4 – Fêmea copulada com espermátóforos impregnados em seu téllico, indicado pelo círculo azul.



Fonte: Elaborada pela autora.

2.2.3 Estágios de maturação gonadal

Os ovários de crustáceos passam por diferentes estágios de maturação, que constituem um ciclo reprodutivo. O desenvolvimento gonadal e a classificação desses estágios são importantes informações da biologia reprodutiva de uma espécie. Para definir esses estágios são observadas atividades inerentes ao ovário e ao hepatopâncreas, uma vez que esses dois órgãos atuam de forma sincronizada durante a vitelogênese. O conhecimento e compreensão deste ciclo reprodutivo é indispensável para maior controle no crescimento e reprodução dos animais (CHANG; SHIH, 1995; MEDINA *et al.*, 1996; SIEBERT, 2015).

A vitelogênese é o processo de formação do vitelo, que é precedida pela formação de vitelogenina, precursora do vitelo, encontrada principalmente na hemolinfa das fêmeas de crustáceos no decorrer da maturação ovariana (PHIRIYANGKUL; UTARABHAND, 2006). A produção de vitelo é de suma importância, pois o mesmo é utilizado como alimento endógeno para os náuplios recém eclodidos, possibilitando sua sobrevivência no primeiro estágio de desenvolvimento, enquanto ainda não conseguem alimentar-se sozinhos. A vitelogênese é

essencial para o acúmulo de nutrientes nos oócitos, o que causa um rápido aumento no tamanho das gônadas (PHIRIYANGKUL *et al.*, 2007).

A maturação ovariana pode ser observada à medida que o órgão passa por uma série de mudanças na coloração e no tamanho durante o seu desenvolvimento. Em muitos estudos morfológicos, mudanças como cor, tamanho e índice gonadal (relação entre o peso da gônada e o peso do animal) também são utilizados como marcador para o desenvolvimento gonadal (SOUSA, 2017). A coloração, espessura, tamanho e ocupação desse órgão no corpo podem variar de acordo com o estágio maturacional. Quando maduros, os ovários podem atingir o último segmento abdominal (Figura 3) e a sua coloração nesse estágio varia de uma espécie para outra, podendo também ser influenciada pela alimentação ofertada aos animais (DALL *et al.*, 1990).

Diversos estudos que observaram as alterações visuais nas colorações das gônadas de peneídeos validaram a diferenciação dos estágios maturacionais através de escala macroscópica de coloração em conjunto com outras características visuais que auxiliaram na determinação desses estágios (MEDINA *et al.*, 1996; AYUB; AHMED, 2002; CRAVEIRO, 2018).

Ainda que as observações macroscópicas auxiliem na classificação dos estágios de maturação ovariana, faz-se necessário o conhecimento morfológico a nível tecidual do desenvolvimento gonadal. Para validar a utilização dessas escalas de cores, técnicas histológicas para análises microscópicas na diferenciação dos estágios também são aplicadas. A análise histológica dos ovários contribui para uma melhor visualização e confiabilidade na diferenciação e classificação dos estágios (MACHADO; DUMONT; D'INCAO, 2009).

As observações microscópicas de cortes histológicos de ovários possibilitam a diferenciação dos estágios de maturação gonadal baseado no desenvolvimento celular e na predominância do tipo de célula visualizada no tecido, que podem apresentar-se como: oogônias, ovócitos pré-vitelogênicos, ovócitos em vitelogênese inicial, ovócitos em vitelogênese avançada, ovócitos maduros e ovócitos atrésicos (CRAVEIRO, 2018).

As classificações dos estágios de desenvolvimento gonadal de fêmeas de camarões peneídeos não apresentam padronização bem definida. Diversos autores classificam a seu modo o desenvolvimento gonadal, denominando-os como: imaturo, em desenvolvimento, maduro e desovado (MACHADO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2017; PEIXOTO *et al.*, 2018). Outros autores os classificam como: imaturo, início de desenvolvimento, em desenvolvimento, maduro e desovado (AYUB e AHMED, 2002; BOLOGNINI *et al.*, 2017; CRAVEIRO, 2018).

Conforme supracitado, a vitelogenina, precursora do vitelo, é sintetizada principalmente no hepatopâncreas e nos ovários de decápodes, secretada na hemolinfa e então acumulada nos ovócitos em desenvolvimento. Níveis de expressão de mRNA de vitelogenina nos locais onde são sintetizados, bem como outros genes relacionados, têm potencial para serem também empregados como marcadores de maturação ovariana, visto que seus níveis flutuam com o ciclo reprodutivo (SIEBERT, 2015; KANG *et al.*, 2014).

Um dos fatores que influenciam diretamente no processo de maturação é a alimentação. Segundo Wouters *et al.* (2001b), o armazenamento de nutrientes pelo animal em quantidades suficientes é crucial para o início da reprodução de camarões, além disso, dietas ricas em lipídios são de extrema importância para a maturação gonadal. Uma dieta adequada é um aspecto determinante para a maturidade sexual e reprodução do camarão cultivado. Em contrapartida, uma dieta insuficiente ou desbalanceada pode causar baixo desempenho reprodutivo e inclusive impedir a reprodução.

2.3 Biotecnologias e expressão gênica na carcinicultura

Na aquicultura, a biotecnologia contribui para a ampliação da produtividade, a partir da aplicação de inovações biotecnológicas, que vão desde melhorias nos sistemas de cultivos, criação e utilização de novos sistemas, utilização de microrganismos benéficos nos mesmos, ao emprego de técnicas de biologia molecular e recursos de engenharia genética na seleção de indivíduos resistentes a doenças ou com outras características desejáveis (FEIJÓ *et al.*, 2016; JAMAL *et al.*, 2019; İRKİN, 2021).

Na produção de organismos cultivados, o melhoramento genético é um tema abordado de forma recorrente, e se trata de um conjunto de técnicas utilizadas para aumentar a frequência de alelos desejáveis em indivíduos de uma população. Para tanto, características externas expressas pelo animal (fenótipo) são monitoradas e genes relacionados a esses caracteres (genótipo) são prospectados e analisados, a fim de descobrir a relação entre fenótipo e genótipo, para selecionar e potencializar características desejáveis nos animais cultivados (ROSA *et al.*, 2013).

Nos estudos de expressão gênica e produção de organismos cultivados, a técnica que se destaca é a RT-qPCR (do inglês *quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction*). Ela é essencial para analisar genes que possam controlar ou estar envolvidos em diversos processos biológicos, desde o desenvolvimento do animal até respostas a estímulos ambientais. Esta técnica possibilita a identificação de RNAs específicos de um gene, assim

como sua quantificação, possibilitando estudos de expressão diferencial, ou seja, quais genes apresentam alteração na expressão quando o organismo está em determinada condição ou ambiente (BUSTIN *et al.*, 2005; BÜTTOW; BONOW, 2013).

Na carcinicultura, avanços e investimentos na área de genética e biotecnologia são mais que necessários, visto que a atividade sofre constantemente problemas relacionados à sanidade, que podem ser minimizados a partir da aplicação de ferramentas genéticas, como melhoramento assistido por marcadores, utilizando a identificação de traços de resistência associados ao genótipo dos animais. A espécie *P. vannamei* tem sido o foco de programas de reprodução seletiva com a finalidade de melhorar o crescimento e a resistência a doenças (JONES *et al.*, 2017).

Através da aplicação das tecnologias da genética moderna, como a realização de estudos de associação genômica, é possível analisar variações nas sequências de DNA em todo o genoma das principais espécies aquícolas. Tal esforço possibilita identificar associações a caracteres fenotípicos de interesse, que aliados às tecnologias de sequenciamento de nova geração, podem fornecer um grande número de SNPs, e utilizar os resultados para a investigação e controle genético dos caracteres relacionados à produtividade, bem como a exclusão de traços não desejados (PANTALIÃO, 2016).

A identificação e quantificação de genes relacionados a funções importantes nos camarões cultivados possibilita saber se determinadas condições ou estímulos ambientais alteram a expressão desses genes e que efeitos essas alterações causam nos animais e conseqüentemente em seu desempenho produtivo. Atualmente, muitos pesquisadores concentram esforços nessa área, principalmente testando alimentos, imunoestimulantes, alterações em condições ambientais, RNAi, estímulos relacionados à reprodução, dentre outros (ROTLLANT *et al.*, 2015; VENTURA-LÓPEZ *et al.*, 2016; FREITAS, 2020; LI *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2022; ABBAS *et al.*, 2023; CHEN *et al.*, 2023; LIU *et al.*, 2023).

Na reprodução do camarão *P. vannamei* em cativeiro, o uso da tecnologia RNAi no desenvolvimento de um método alternativo à ablação do pedúnculo ocular foi testado pela primeira vez por Feijó *et al.* (2016), para inibir transcrições de GIH em fêmeas de *P. vannamei*. Como resultado desse estudo, os autores notaram aumento na expressão de mRNA de vitelogenina no ovário 37° dia após a injeção com duplas fitas de RNA específicas.

A maioria dos trabalhos de expressão gênica relacionados à reprodução de camarões peneídeos analisa principalmente a vitelogenina (*vlg*), seus receptores (*vlgR*) e o hormônio inibidor da vitelogênese (*vih*), e poucos trabalhos se propõem a explorar mais genes (KANG *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2015; VENTURA-LÓPEZ *et al.*, 2016).

O nível de expressão dos transcritos de vitelogenina nos ovários de fêmeas é maior quando comparado com a sua expressão no hepatopâncreas em todas as fases do ciclo de muda, se expressando mais fortemente em fêmeas em processo de maturação. A síntese e captação de vitelogenina através do processo de maturação e a alta expressão de receptor de vitelogenina observadas em estágios pré-vitelogênicos, sugerem um papel importante deste para a maturação completa da gônada, possivelmente preparando o oócito para o próximo estágio de maturação. A inibição de VTGR pode resultar em uma expressão diminuída de proteínas do vitelo e diâmetro do oócito, impedindo o desenvolvimento gonadal como resultado. VIH é o hormônio regulador negativo mais potente da reprodução de crustáceos, e modula criticamente a maturação ovariana suprimindo a síntese de vitelogenina (LUO *et al.*, 2015; VENTURA-LÓPEZ *et al.*, 2016).

Rotllant *et al.* (2015) identificaram genes envolvidos na reprodução e no metabolismo da via lipídica em *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798), correlacionando sua expressão com o desempenho reprodutivo. A partir de amostras do hepatopâncreas e ovários, foram criadas bibliotecas de cDNA permitindo a identificação de genes ortólogos chaves em reprodução e nutrição de *P. monodon* (vitelogenina, receptor da vitelogenina, proteína cortical, ácido graxo elongase, sintase de ácido graxo, proteína de ligação de ácido graxo, ciclooxigenase, enzima 4C do citocromo P450). Esses resultados indicaram que os genes que codificam enzimas envolvidas nas vias do metabolismo lipídico podem ser potenciais biomarcadores para avaliar o desempenho reprodutivo.

Para investigar melhor os genes envolvidos na reprodução de *P. vannamei*, Ventura-López *et al.* (2017) construíram bibliotecas com dados derivados de material genético do pedúnculo ocular e gônadas de fêmeas, permitindo a identificação de sequências expressas que tem um potencial papel na regulação da maturação gonadal. Essa associação com a maturação gonadal foi avaliada pela análise da expressão da vitelogenina. Os resultados indicaram que a expressão de membros da família do receptor de vitelogenina tem papel importante durante a pré-vitelogênese. Além desses, um outro importante gene teve seu papel melhor esclarecido, o transcrito do receptor gama de progestina de membrana (*mprg*), altamente expresso no hepatopâncreas e intestino, e principalmente nas gônadas de fêmeas, aumentando durante a maturação oocitária.

Informações básicas relativas à atividade reprodutiva e aspectos moleculares relacionados ao desenvolvimento gonadal de *P. vannamei* são escassas, quando comparados a estudos de expressão gênica abordando aspectos imunológicos gerais para essa mesma espécie. Já são bem descritos e em maior quantidade os genes analisados com funções imunológicas em

P. vannamei. Dentre estes podem ser citados: *proPO*, *Hsp70*, Superóxido dismutase (*SOD*), *peneidinas* e *crustinas*. Em estudo recente, Eldessouki *et al.* (2022), constataram que a expressão de transcritos de genes imunológicos como *SOD*, *CAT* e *GPx* foi modulada mediante oferta de dieta contendo astaxantina em animais infectados por *Vibrio harveyi*, conferindo resposta imunológica e aumento de resistência ao patógeno.

Silveira *et al.* (2018) criaram um atlas de expressão de genes relacionados ao sistema imunológico do sistema digestivo do camarão em resposta a patógenos, trazendo informações sobre o envolvimento de hemócitos na imunidade intestinal. Gagliardi (2020) descreveu a imunidade intestinal em camarões *P. vannamei* através da análise de expressão gênica de animais infectados com WSSV, notando a modulação de vários dos genes analisados.

Para nutrição, alguns genes são descritos e utilizados, tais como: *α -amilase*, *lipase*, *tripsina*, *proteína de ligação a ácidos graxos* e *ácido graxo sintase*, e suas funções estão intimamente associadas a digestão e aproveitamento do nutriente ao qual faz menção sua nomenclatura. Duan *et al.* (2018) testaram o efeito da suplementação alimentar de *P. vannamei* com probiótico *Clostridium butyricum* na imunidade desses camarões, concluindo que o referido probiótico modula a expressão de genes imunológicos presentes no intestino.

Assim como para reprodução, também são poucos os trabalhos que descrevam e investiguem transcritos relacionados à nutrição. Diante dessa escassez, trabalhos nesta temática têm grande relevância. Frente aos avanços na área de biotecnologias e biologia molecular, e das ferramentas disponíveis, cabe ao setor investir cada vez mais em esforços que possam gerar maior entendimento do processo reprodutivo como um todo, e em seus aspectos moleculares. Isso possibilitará melhor compreensão da relação entre a expressão de genes chaves e estímulos externos, tais como alimentação, estágio de maturação, idade reprodutiva, tempo em produção, dentre outros aspectos importantes, otimizando o processo produtivo, embasando-o em conhecimento científico apropriado.

2.4 Nutrição de camarões peneídeos

De modo geral, camarões peneídeos são classificados como onívoros. Porém, algumas espécies, quando na fase adulta, podem ser também detritívoras ou carnívoras. Os nutrientes (proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais) necessários para a construção e manutenção dos tecidos, bem como de suprimento energético são fornecidos aos animais cultivados principalmente através de rações formuladas, a depender da fase de vida do animal. Nos estágios naupliares nutrem-se apenas do vitelo; zoea I-II alimentam-se de partículas

menores que 53 μm , como microalgas; de zoea III a m $\acute{\text{e}}\text{s}$ is II s $\acute{\text{a}}$ o alimentados com fitopl $\acute{\text{a}}$ nc $\acute{\text{o}}$ n e zoopl $\acute{\text{a}}$ nc $\acute{\text{o}}$ n, como rot $\acute{\text{i}}$ feros e n $\acute{\text{a}}$ uplios de art $\acute{\text{e}}$ mia, e tamb $\acute{\text{e}}$ m j $\acute{\text{a}}$ recebem ra $\acute{\text{c}}\text{o}$ es pr $\acute{\text{o}}$ prias para essa fase larval, e a partir de m $\acute{\text{e}}\text{s}$ is III a oferta de ra $\acute{\text{c}}\text{o}$ o $\acute{\text{e}}$ intensificada, incluindo ainda biomassa de art $\acute{\text{e}}$ mia. Quando transferidos para os viveiros de engorda, os animais consomem o alimento natural do viveiro, composto por microalgas e pequenos crust $\acute{\text{a}}$ ceos, poliquetas, moluscos, algas, detritos, entre outros organismos que comp $\acute{\text{o}}$ em o zoopl $\acute{\text{a}}$ nc $\acute{\text{o}}$ n. Nessa etapa, a ra $\acute{\text{c}}\text{o}$ o $\acute{\text{e}}$ o principal alimento ex $\acute{\text{o}}$ geno ofertado (BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001; BARBIERI JUNIOR; OSTRENSKY NETO, 2002).

Para o bom desempenho dos camar $\acute{\text{o}}$ es cultivados, o conhecimento de sua exig $\acute{\text{e}}$ ncia nutricional $\acute{\text{e}}$ indispens $\acute{\text{a}}$ vel, bem como o conhecimento sobre as fontes nutricionais dos ingredientes utilizados nas formula $\acute{\text{c}}\text{o}$ es de ra $\acute{\text{c}}\text{o}$ es. A sa $\acute{\text{u}}$ de e desempenho zoot $\acute{\text{e}}$ cnico desses animais dependem diretamente da alimenta $\acute{\text{c}}\text{o}$ o fornecida (WOUTERS *et al.*, 2001b).

Na carcinicultura, o maior custo de produ $\acute{\text{c}}\text{o}$ o $\acute{\text{e}}$ com a alimenta $\acute{\text{c}}\text{o}$ o, podendo representar mais de 50% das despesas de uma fazenda de cultivo. Normalmente a prote $\acute{\text{i}}$ na $\acute{\text{e}}$ o nutriente mais caro na elabora $\acute{\text{c}}\text{o}$ o de uma dieta para camar $\acute{\text{o}}$ o, podendo representar at $\acute{\text{e}}$ 60% do custo de produ $\acute{\text{c}}\text{o}$ o da ra $\acute{\text{c}}\text{o}$ o. A concentra $\acute{\text{c}}\text{o}$ o ideal desse nutriente em ra $\acute{\text{c}}\text{o}$ es $\acute{\text{e}}$ definida pelo balan $\acute{\text{c}}$ o entre energia e prote $\acute{\text{i}}$ na. Quantidade excessiva de prote $\acute{\text{i}}$ na em rela $\acute{\text{c}}\text{o}$ o $\acute{\text{a}}$ energia resulta em redu $\acute{\text{c}}\text{o}$ o da taxa de crescimento e no aumento da excre $\acute{\text{c}}\text{o}$ o nitrogenada, o que $\acute{\text{e}}$ indesejado no cultivo (CYRINO *et al.*, 2010).

O fornecimento de lip $\acute{\text{i}}$ dios baseia-se na satisfa $\acute{\text{c}}\text{o}$ o das necessidades de nutrientes espec $\acute{\text{i}}$ ficos, tais como $\acute{\text{a}}$ cidos graxos insaturados de cadeia longa, fosfolip $\acute{\text{i}}$ dios, e colesterol para o fornecimento de energia. Os crust $\acute{\text{a}}$ ceos s $\acute{\text{a}}$ o reconhecidos por terem uma capacidade limitada para s $\acute{\text{i}}$ ntese de $\acute{\text{a}}$ cidos graxos insaturados de cadeia longa e nenhuma capacidade para a s $\acute{\text{i}}$ ntese de colesterol, necessitando adquiri-los dos alimentos (WOUTERS *et al.*, 2001b). Os fosfolip $\acute{\text{i}}$ dios atuam aumentando a emulsifica $\acute{\text{c}}\text{o}$ o, digest $\acute{\text{o}}$ o e a absor $\acute{\text{c}}\text{o}$ o de colesterol, e tamb $\acute{\text{e}}$ m facilitam o seu transporte e mobiliza $\acute{\text{c}}\text{o}$ o (GONG *et al.*, 2004).

Para carboidratos, o camar $\acute{\text{o}}$ o n $\acute{\text{a}}$ o possui exig $\acute{\text{e}}$ ncia diet $\acute{\text{e}}$ tica espec $\acute{\text{i}}$ fica (NRC, 2011), no entanto, a inclus $\acute{\text{o}}$ o destes compostos nas ra $\acute{\text{c}}\text{o}$ es pode fornecer caracter $\acute{\text{i}}$ sticas f $\acute{\text{i}}$ sicas desej $\acute{\text{a}}$ veis, como a manuten $\acute{\text{c}}\text{o}$ o da textura das part $\acute{\text{i}}$ culas da ra $\acute{\text{c}}\text{o}$ o e a estabilidade na $\acute{\text{a}}$ gua, caracterizando-se ainda como uma fonte de energia barata, sendo usados para a s $\acute{\text{i}}$ ntese de quitina para a forma $\acute{\text{c}}\text{o}$ o do exoesqueleto. Quanto $\acute{\text{a}}$ s exig $\acute{\text{e}}$ ncias nutricionais de vitaminas e minerais pelos camar $\acute{\text{o}}$ es para formula $\acute{\text{c}}\text{o}$ o de dietas, pouco se sabe. Grande parte da dificuldade de obter essas informa $\acute{\text{c}}\text{o}$ es deve-se ao desafio da perda destes nutrientes por lixiviac $\acute{\text{o}}$ o na $\acute{\text{a}}$ gua, e a dificuldade de determina $\acute{\text{c}}\text{o}$ o dessas exig $\acute{\text{e}}$ ncias, visto que at $\acute{\text{e}}$ certo ponto, o camar $\acute{\text{o}}$ o $\acute{\text{e}}$ capaz

de utilizar alguns minerais dissolvidos na água de cultivo para satisfazer as suas necessidades metabólicas (VELASCO-ESCUADERO; LAWRENCE, 2010).

2.4.1 Exigências nutricionais na fase reprodutiva

O desempenho reprodutivo dos animais de cultivo é geralmente menor que o de espécimes em seu habitat natural capturados na natureza, principalmente devido às aparentes deficiências nutricionais dos camarões produzidos em laboratório quando comparados aos animais que se alimentam dos inúmeros recursos disponíveis em seu próprio habitat (PALACIOS; IBARRA; RACOTTA, 2000).

A alimentação de reprodutores de camarões cultivados ainda é bastante dependente de alimentos frescos como lulas, poliquetas, biomassa de artêmia, mexilhões e ostras, e por mais que sejam alimentos altamente nutritivos, podem ser considerados desfavoráveis devido ao risco de propagação e transmissão de doenças em ambientes de biossegurança como o setor de maturação, alto custo, necessidade de congelamento, e também a qualidade nutricional inconsistente dessas fontes de alimentação. Substituição de alimentos frescos por alimentos formulados são essenciais para a criação segura e econômica de camarões domesticados (WOUTERS *et al.*, 2002).

A nutrição desses animais tem um importante papel em seus processos reprodutivos, principalmente os níveis de lipídios totais e específicos da dieta. Há relatos de que durante a reprodução o conteúdo de lipídios diminui no hepatopâncreas e é transferido para o ovário na maturação, que é, portanto, diretamente influenciada pelo nível de lipídios contido na dieta (WOUTERS *et al.*, 2001a; GLENCROSS, 2009).

Os lipídios ingeridos são convertidos no hepatopâncreas em lipídios polares e glicoproteínas, como no caso da vitelina e lipovitelina. Durante o ciclo reprodutivo, essas proteínas são transportadas aos ovários através da hemolinfa. Enquanto os ovários alcançam o estágio maduro e conseqüentemente a maior concentração lipídica, a quantidade de lipídios no hepatopâncreas diminui, indicando a mobilização dos lipídios do hepatopâncreas às gônadas. Quando as fêmeas se encontram imaturas ou em estágios iniciais de maturação é observado o acúmulo de lipídios no hepatopâncreas (CAVALLI *et al.*, 2001).

Os lipídios são frequentemente adicionados às dietas na forma de óleos, principalmente óleos de peixe e soja. Já os fosfolipídios são adicionados a partir da inclusão da lecitina de soja. O óleo de peixe marinho é comumente utilizado como o principal ingrediente lipídico em alimentos para organismos aquáticos, no entanto, a diminuição no fornecimento

global de óleo de peixe devido à redução do estoque pesqueiro e o seu custo elevado vem alertando a indústria sobre a necessidade da utilização de fontes alternativas de lipídios na elaboração de alimentos para organismos aquáticos cultivados (SUN *et al.*, 2020).

A riqueza relativa no sentido de diversidade e disponibilidade de plantas torna os óleos vegetais uma boa alternativa e fonte sustentável. A soja e seus derivados já vêm sendo empregados com sucesso na formulação de dietas, e trabalhos com nutrição de reprodutores de *P. vannamei* também já foram realizados (MANEII *et al.*, 2019; CAHU *et al.*, 1994). A lecitina de soja é a fonte comercial mais acessível de fosfolipídios para alimentação na aquicultura. Foi confirmado que sua incorporação nas dietas de reprodutores pode levar à maturação sexual e promover o desempenho reprodutivo, melhorando a mobilização de lipídios do hepatopâncreas para os ovários (CAHU *et al.*, 1994).

Maneii *et al.* (2019) concluíram que quando incorporado em quantidade ideal, a lecitina de soja melhora o crescimento e desempenho reprodutivo comprovado por meio da expressão gênica de vitelogenina no hepatopâncreas, bem como mobilização lipídica induzida através da hemolinfa e do transporte do hepatopâncreas para os ovários. De acordo com Sun *et al.* (2020), óleos vegetais como o de soja e canola podem ser melhores fontes de lipídios para *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) que o óleo de peixe, o que pode ser atribuído ao estado oxidativo modificado induzido pela via de sinal e pelos bons resultados obtidos no crescimento dos animais testados.

Grandes avanços podem ser notados e inúmeros trabalhos vêm sendo realizadas no campo de nutrição do camarão, no entanto, especificamente para reprodutores há poucos trabalhos disponíveis na literatura, principalmente relacionados à inclusão ou substituição de ingredientes, reforçando a necessidade de estudos na área de alimentação para reprodutores (LIANG *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2022; TESSER *et al.*, 2019; CAHU *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 2020; MANEII *et al.*, 2019).

2.5 Óleo de coco como fonte de lipídios

Os óleos vegetais podem ser considerados alternativas promissoras de fonte lipídica para nutrição de camarões, por causa de seu baixo preço, alto rendimento e presença de ácidos graxos insaturados, como ácido linoleico (Chen *et al.*, 2020). Diante desse potencial e da problemática de escassez e elevado preço do óleo de peixe, óleos de diversas fontes vegetais já foram testados em trabalhos de nutrição de espécies aquícolas (LIM *et al.*, 1997; GONZÁLEZ-

FÉLIX *et al.*, 2002; CORDEIRO-JÚNIOR, 2011; SOUSA, 2017; COUTO *et al.*, 2021; LIANG *et al.*, 2022).

O Brasil ocupa uma relevante posição na produção de alimentos de origem vegetal. Em 2020, foi o quarto maior produtor mundial de grãos como arroz, milho, cevada, trigo e soja (EMBRAPA, 2020). Ainda sobre a produção vegetal, o país demonstra grande potencial produtivo de coco, o fruto do coqueiro, cientificamente denominado *Cocos nucifera* (Linnaeus, 1753). Em 2018 uma área de aproximadamente 200 mil hectares foi destinada ao cultivo de coqueiros, colocando o país como um dos maiores produtores mundiais desse fruto, que apresenta derivados alimentícios bastante consumidos e bem aceitos, como a água, polpa fresca, leite, óleo de coco, coco ralado e outros subprodutos (SANTANA; SILVA; MULDER, 2020).

O Nordeste é a região do Brasil que mais produz coco e seus derivados, com grande número de indústrias de alta capacidade de produção e processamento para as mais distintas finalidades, dentre elas a produção do óleo de coco virgem, que se destaca como um suplemento alimentar, apresentando vários benefícios para a saúde humana e animal, devido suas propriedades antioxidante, umectante, hidratante, antifúngica e antibacteriana (SOUSA, 2018; COUTO *et al.*, 2021).

O óleo é extraído do endosperma do coco maduro, uma vez que este acumula elevado teor lipídico. Pode ser extraído por meio de prensagem, solventes e processos caseiros. De forma artesanal é extraído a partir do leite de coco, devendo ser deixado em repouso ou resfriado para a separação em três fases: água, óleo e creme (sobrenadante). No processo a frio, o óleo é coletado e filtrado, possuindo aspecto incolor e aroma suave de coco (WONGPOOWARAK *et al.*, 2009; SANTANA; SILVA; MULDER, 2020).

O óleo de coco é constituído por lipídios. Os ácidos graxos predominantes são: ácido láurico (45-53%), mirístico (16-21%), palmítico (7-10%), caprílico (5-10%) e cáprico (5-8%) e o principal triacilglicerol é a trilaurina (22,2–23,9%), a qual consiste em um glicerol esterificado com 3 ácidos láuricos. As gorduras láuricas, encontradas em maior concentração, são resistentes a oxidação, e por isso bastante utilizadas na indústria cosmética e alimentícia. Apresenta ainda em sua composição ácidos oleicos e linoleicos (MACHADO *et al.*, 2006; SANTANA; SILVA; MULDER, 2020).

Dentre os maiores produtores de coco do país, quatro são do Nordeste, respondendo por mais da metade da produção nacional. O Ceará é o segundo maior produtor e com potencial notório de crescimento, visto que possui vasto litoral e perímetros irrigados bem desenvolvidos, o que favorece o fortalecimento da atividade (CAVALCANTE, 2015). A abundância da matéria prima para fabricação do óleo de coco no país e no estado do Ceará, um dos maiores produtores

de camarão do Brasil, caracteriza-se como uma oportunidade de explorar a potencial aplicação desse insumo na alimentação de camarões marinhos cultivados.

Dentre os estudos realizados com óleos vegetais na dieta de espécies aquícolas, poucos são os que testaram o óleo de coco como fonte lipídica para reprodutores (LIM *et al.*, 1997; GONZÁLEZ-FÉLIX *et al.*, 2002; SOUSA, 2017; COUTO *et al.*, 2021).

Sousa (2017) ao avaliar os efeitos da adição de óleo de coco e outros tipos de óleos na maturação ovariana de fêmeas do camarão *M. amazonicum*, notou maior ganho de peso, maior vacuolização das células B na glândula digestiva e maior quantidade de oócitos maduros em animais alimentados com ração contendo óleo de coco quando comparadas às suplementadas com outros óleos vegetal e animal (linhaça e peixe, respectivamente).

Dietas à base de óleos vegetais (coco, cártamo, milho, soja e linhaça) foram empregadas por Lim *et al.* (1997) para avaliar o desempenho de juvenis de *P. vannamei*. Destes, o óleo de soja foi o que exibiu melhores resultados em comparação aos demais (ácido esteárico, óleos de coco, cártamo, milho, soja, linhaça e peixe), com melhor taxa de conversão alimentar dentre os tratamentos, perdendo apenas no ganho de peso dos indivíduos alimentados com óleo de linhaça, e na sobrevivência dos alimentados com óleo de girassol.

González-Félix *et al.* (2002) avaliaram o crescimento e sobrevivência de *P. vannamei* alimentados com dietas contendo diferentes óleos vegetais como fonte lipídica (óleo de coco, soja, linhaça e amendoim) e uma fonte lipídica de origem animal (óleo de savelha), não encontrando diferença significativa entre os tratamentos que utilizaram fontes lipídicas vegetais, no entanto, o óleo de savelha apresentou menores taxas de conversão alimentar e melhores taxas de crescimento comparado aos óleos de origem vegetal.

Para a espécie de peixe tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816), o óleo de coco atuou como um nutracêutico, melhorando seu desempenho produtivo e sanidade, apresentando ação imunoestimulante quando os animais foram submetidos a infecção por bactéria patogênica (COUTO *et al.*, 2021).

Não foram encontrados na literatura trabalhos com óleo de coco na dieta de reprodutores de *P. vannamei*, o que demonstra que ainda há muito a ser explorado no que diz respeito a busca por fontes lipídicas oriundas de matéria prima local abundante e acessível que possam ser incorporadas na ração para suprir ou diminuir a grande necessidade de inclusão de óleo de peixe nas dietas para reprodutores. O óleo de coco caracteriza-se como um bom candidato, diante da abundância e de suas propriedades já descritas.

O armazenamento suficiente de nutrientes para o início da reprodução de camarões é indispensável, e por esta razão dietas ricas em lipídios são importantes para a maturação

gonadal (WOUTERS *et al.*, 2001). O requerimento de lipídios para o desenvolvimento ovariano depende da imediata ingestão de dietas com esse nutriente, visto que de uma forma geral, os crustáceos têm habilidade limitada para biossíntese de fosfolipídios, o que torna ainda mais necessário o desenvolvimento de pesquisas que avaliem o potencial lipídico de fontes mais acessíveis e sustentáveis.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito da suplementação de dieta comercial com óleo de coco sobre a reprodução, nutrição e imunologia de camarões *Penaeus vannamei*.

3.2 Específicos

- Avaliar o desempenho reprodutivo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco, por meio das taxas de cópula, desovas e eclosão, número de ovos e de náuplios, análises macroscópicas e histológicas das gônadas, e expressão de genes relacionados à reprodução.
- Verificar os efeitos do óleo vegetal em aspectos histológicos, imunológicos e nutricionais, através da análise de expressão de genes, contagem total de hemócitos, histologia do hepatopâncreas e intestino.
- Analisar, com base nos parâmetros avaliados, se há variação ao longo dos três meses de experimento, na capacidade de cópulas e desovas das fêmeas ao longo de um ciclo produtivo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos animais e aclimatação

Os experimentos de alimentação dos reprodutores de camarões marinhos *P. vannamei* foram conduzidos em um laboratório de produção de pós larvas no litoral oeste do Ceará, localizado no município de Acaraú, nas instalações da empresa Aquacrusta Marinha LTDA, e teve duração de quatro meses.

Para a execução do experimento foi realizada despesca de um viveiro contendo camarões cultivados exclusivamente com finalidade de serem futuros reprodutores. Foram selecionados durante a despesca 1.200 camarões, separados por sexo, correspondendo a 600 machos e 600 fêmeas, com peso médio de $42 \text{ g} \pm 1,1 \text{ g}$ e $47 \text{ g} \pm 1,6 \text{ g}$, respectivamente. Todos são do mesmo lote, e portanto, possuem a mesma idade (± 8 meses) e tempo de cultivo. Os camarões foram transportados em caixas de transporte contendo água e oxigenação nas concentrações adequadas e transferidos para quatro tanques de fibra de 9,8 toneladas cada, instalados no setor de aclimatação da maturação.

Nos tanques supracitados ocorreu a aclimatação dos animais distribuídos por sexo nas seguintes quantidades: dois tanques contendo 300 machos cada, e dois tanques contendo 300 fêmeas cada. Os tanques de aclimatação foram identificados de acordo com os tratamentos da seguinte forma: Tq1: MR (Machos alimentados com Ração); Tq2: MRO (Machos alimentados com Ração suplementada com Óleo de coco); Tq3: FR (Fêmeas alimentadas com Ração); Tq4: FRO (Fêmeas alimentadas com Ração suplementada com Óleo de coco).

Durante todo o período experimental, parâmetros como salinidade (31 psu), temperatura ($\cong 28 \text{ }^\circ\text{C}$), oxigênio ($\cong 5,5 \text{ mg/L}$) e pH ($\cong 7,4$) foram monitorados e mantidos dentro dos limites recomendados para o cultivo da espécie.

4.2 Dietas e delineamento experimental

Antes da transferência para os tanques de aclimatação, em seus viveiros de origem, os camarões alimentavam-se unicamente de alimento natural contido no próprio ambiente. Nos três primeiros dias após a transferência foram alimentados apenas com ração para que pudessem adaptar-se ao novo alimento. A ração utilizada foi a comercial semi-úmida para reprodutores (Redi-Mate da Zeigler Bros., Inc Copyright ©) que apresentava as seguintes informações nutricionais (Tabela 1). A mesma ração foi utilizada durante todo o experimento.

Tabela 1 – Composição da ração comercial ofertada aos reprodutores de *P. vannamei*.

Componente	Proteína	Gordura	Fibra	Umidade	Cinza	Fósforo
% Min ou Max.	Min. 40	Min. 9	Max. 2	Max. 30	Max. 10	Min. 1

Fonte: Elaborada pela autora, conforme informações do rótulo do produto.

A ração ofertada para os animais do grupo testado já foi desde o início da aclimação/treinamento alimentar, suplementada com óleo de coco (2,5%). Durante o período em que foram alimentados apenas com ração, a mesma foi ofertada em cinco horários ao longo do dia (00:00, 02:00, 10:00, 13:00, 20:00h). A quantidade inicial por horário foi de 0,6% em relação ao peso corporal na primeira oferta, e nas demais a quantidade foi aumentada ou diminuída de acordo com a saciedade aparente dos animais de cada tanque.

Decorridos os dias de adaptação, até o final do experimento, os camarões passaram a receber alimentação padrão da maturação com adaptações estabelecidas para o presente trabalho, conforme exposto na Tabela 2. A porcentagem de cada alimento foi calculada com base na biomassa total de camarões contidos no tanque, totalizando 24% de oferta diária de alimentos em relação ao peso corpóreo dos camarões. As quantidades foram ajustadas após cada biometria semanal, ou de acordo com as sobras ou falta de alimento constatadas diariamente.

Tabela 2 – Alimentação diária dos reprodutores de *P. vannamei*.

Horário	00:00	02:00	10:00	13:00	20:00
Alimento	Lula	Ração comercial	Ração comercial	Lula	Marisco
%BM/trato	8	1	1	8	6

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a aclimação, que durou 10 dias, a maioria das fêmeas se encontrava no período intermuda. Decorrido os 10 dias, as mesmas foram submetidas ao procedimento de ablação unilateral do pedúnculo ocular. Tal procedimento foi feito com auxílio de uma linha, amarrada a um dos pedúnculos (Figura 5), ocasionando após quatro dias a perda do mesmo, e conferindo estímulo à maturação gonadal.

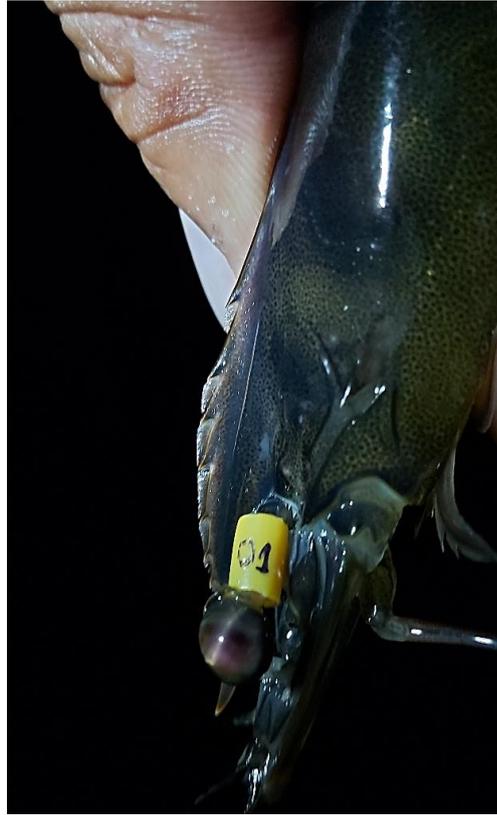
Figura 5 – Procedimento de ablação.



Fonte: Elaborada pela autora.

Decorridos sete dias da ablação, quando as fêmeas já estavam sem um pedúnculo ocular e com grande porcentagem de camarões maduros, foi realizada a formação das famílias, que consistiu na distribuição dos animais em tanques de produção de 20 m² cada, na densidade de 3 animais por m², utilizando a proporção sexual de 1:1, sendo em cada um dos tanques 70 machos e 70 fêmeas. Cada uma das fêmeas foi marcada utilizando anéis de marcação numerados e com cores distintas (Figura 6) para cada um dos seis tanques, o que possibilitou acompanhar parte do desempenho reprodutivo individual e a devolução das fêmeas para seus tanques de origem após o procedimento de desova.

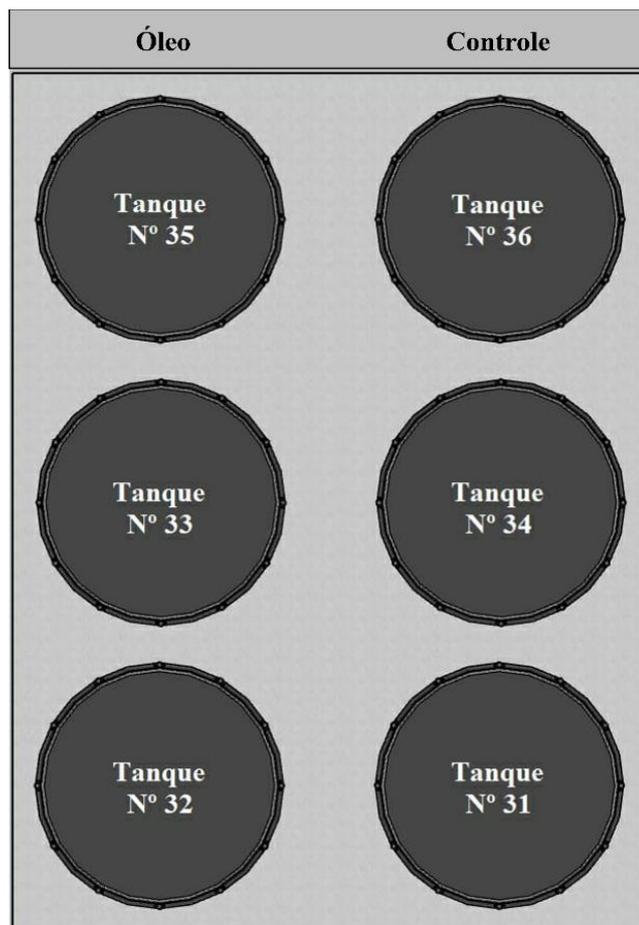
Figura 6 – Fêmea marcada com anel em seu pedúnculo ocular.



Fonte: Elaborada pela autora.

Ao todo foram utilizados seis tanques, divididos em dois tratamentos: A) Controle (camarões alimentados com ração sem óleo); B) Teste (camarões alimentados com ração suplementada com óleo de coco) (Figura 7).

Figura 7 – Desenho esquemático da disposição dos tanques no setor de produção.



Fonte: Elaborada por Álvaro Luccas Bezerra dos Santos e Juliana Oliveira de Freitas.

Para o tratamento B, em que os animais foram alimentados com ração suplementada com óleo de coco, diariamente foram feitas misturas de ração com óleo de coco comercial. O óleo utilizado foi o extra virgem da marca Copra, prensado e extraído a frio da polpa do coco seco, 100% natural e sem adição de conservantes, com propriedades antioxidantes, rico em TCM (Triglicerídeos de Cadeia Média) e fonte de ácido láurico, ácido caprílico e vitamina E, com acidez máxima de 0,3%, segundo informações do fabricante.

O mesmo foi adicionado à ração na quantidade de 2,5% em relação ao peso total da ração ofertada, que posteriormente eram secas em estufa a 50 °C por 6 horas e armazenadas em potes plásticos à temperatura ambiente até o momento da oferta. A porcentagem de óleo de coco a ser adicionada na ração foi definida com base em teste prévio à realização do experimento, com camarões de outros tanques e outro lote, onde observou-se maior consumo/aceitação da ração pelos animais na concentração de 2,5% quando comparadas às concentrações de 1% e 5% que também foram testadas.

As sobras de alimentos, quando existentes, foram removidas através de sifonagens diárias realizadas às 08:00 e 17:00 horas. No setor de maturação e cópula, local onde os tanques

experimentais foram instalados, utilizou-se fotoperíodo invertido com 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

No setor de cópula ocorreu o acasalamento entre machos e fêmeas no período claro, onde os machos depositavam no téllico das fêmeas suas bolsas espermáticas (espermatóforos), que ficavam impregnadas. No início do período escuro, com auxílio de uma lanterna foi realizada a checagem, por volta das 06:00 horas de cada dia. Essa atividade consistia em observar as fêmeas maduras que foram copuladas e transferi-las para os tanques de desova. No setor de desova foram utilizados dois tanques de desovas coletivas, referentes a cada um dos tratamentos, com as mesmas dimensões dos tanques de produção, contendo água filtrada e tratada com EDTA, com salinidade 31 psu, sem aeração, onde as fêmeas copuladas permaneceram por volta de sete horas até que fosse realizada a desova.

Às 13:00 horas de cada dia, as fêmeas dos tanques de desova foram individualmente devolvidas aos seus tanques de origem, e nesse momento era observado se a mesma desovou. Nos tanques de desova observava-se ainda se houve abortos, que é caracterizado pela liberação precoce de uma massa gonadal com um aglomerado de ovos que ainda estavam em seu processo de formação e que não foram fecundados.

Após a devolução das fêmeas para os tanques de produção foi realizada a drenagem dos ovos que foram coletados em dois carboys com telas filtrantes, uma para cada tratamento, e submetidos a lavagem com fluxo contínuo e intenso de água para eliminação de resíduos. Finalizada a lavagem dos ovos, os mesmos foram transferidos para o setor de eclosão, até que nascessem os náuplios, que no dia seguinte eram transferidos para lavadores na sala de náuplios onde permaneceram até o estágio de náuplio V, momento em que eram contados, embalados e transferidos para os tanques de larvicultura, onde foram cultivados até atingirem o estágio de pós larvas.

Todas as etapas acima citadas foram acompanhadas diariamente durante três meses, gerando dados que possibilitaram a comparação do desempenho dos camarões dos diferentes tratamentos ao longo do tempo. Além dos parâmetros de desempenho reprodutivo analisados com os dados que foram coletados diariamente, outros aspectos, tais como observações histológicas, índices hepatossomáticos e gonadossomáticos, contagem hemocítica e expressão gênica também foram analisados, e para tanto foram realizadas coletas ao longo do experimento para a realização dessas análises.

4.3 Coletas

Cada tratamento foi realizado em triplicata, ou seja, foram utilizados três tanques de produção por tratamento. Ao longo do período experimental, seis coletas foram realizadas, distribuídas nos intervalos de tempo de produção descritos a seguir (Tabela 3). Em cada coleta foram extraídas três fêmeas por tanque, totalizando nove por tratamento, coletadas aleatoriamente. As fêmeas foram coletadas com auxílio de um puçá, transferidas para um balde contendo água fria e levadas para a sala de extração de tecidos.

Cada camarão coletado teve seu número anotado, foi seco, pesado e identificado macroscopicamente quanto ao seu nível de maturação. Em seguida, foi coletada hemolinfa para contagem de hemócitos; intestino, ovários e hepatopâncreas para histologia, ovários e hepatopâncreas para expressão gênica e índices gonadossomáticos e hepatossomáticos.

Tabela 3 – Identificação dos pontos de coletas.

Coleta	Identificação dos pontos de coletas
1°	Um dia antes da ablação
2°	Quatro dias após ablação
3°	Uma semana em produção
4°	Um mês em produção
5°	Dois meses em produção
6°	Três meses em produção (Final do experimento)

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Desempenho reprodutivo

O desempenho reprodutivo das fêmeas de *P. vannamei* foi avaliado através da análise comparativa dos parâmetros abaixo apresentados entre os tratamentos controle e tratamento das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco.

Contados a partir do primeiro dia em produção, que representa o primeiro dia em que houve checagem das fêmeas copuladas e transferência das mesmas para o setor de desova, o experimento teve duração de 3 meses. Nestes, houve observação diária e coleta de dados de desempenho reprodutivo. Foram realizadas checagens em 74 dias, com intervalos de cerca de 6 dias a cada mês de produção para descanso dos animais, esterilização mais rigorosa do setor de desova e atendendo à programação da empresa.

4.4.1 Taxa de cópula

As taxas de cópulas (T_C) foram calculadas para cada um dos tratamentos utilizando a fórmula abaixo:

$$T_C = N_{FT} \times 100 / N_{FP}$$

Onde:

T_C = Taxa de cópula;

N_{FT} = Número de fêmeas transferidas diariamente para o setor de desova;

N_{FP} = Número de fêmeas em produção.

4.4.2 Taxa de desovas

Após o término do período estabelecido para a desova, na devolução dos animais para seus tanques de origem, verificava-se se a fêmea havia ou não desovado, incluindo essa informação nos cálculos das taxas de desovas (T_D), que foi obtido a partir da seguinte equação:

$$T_D = N_{FC} \times 100 / N_{FD}$$

Onde:

T_D = Taxa de desova;

N_{FC} = Número de fêmeas copuladas levadas ao setor de desova;

N_{FD} = Número de fêmeas que desovaram.

A utilização de marcadores de identificação nas fêmeas possibilitou saber a frequência de desova individual, o intervalo de tempo entre uma desova e outra, e assim comparar fêmeas que desovaram mais ou menos nos distintos tratamentos.

4.4.3 Abortos

Conforme citado na seção de delineamento experimental, diariamente após a desova e momentos antes da devolução das fêmeas para seus tanques de origem, verificava-se o número de abortos por tratamento, a partir da observação da visualização de massa com aglomerado de ovócitos não fecundados, no fundo do tanque e também observando a região gonadal de cada fêmea para constatar se a desova tinha sido concluída.

4.4.4 Número de ovos

Conforme descrito no subtópico de delineamento experimental (4.2), os ovos liberados pelas fêmeas nos tanques de desova foram drenados por gravidade para lavadores com volume útil de 425 litros, onde passaram por intensa lavagem em água corrente e fluxo contínuo. Após a lavagem dos ovos, antes de serem transferidos para o setor de eclosão, foram coletadas amostras para contagem dos mesmos. As contagens foram feitas de forma manual macroscopicamente. A partir de três amostras coletadas, cada uma tendo cinco mL, obteve-se a média do número de ovos neste volume, possibilitando a partir daí estimar a quantidade de ovos por lavador (N_{OLV}) e conseqüentemente por tanque de desova e por fêmea (N_{OF}), através de extrapolação e dos seguintes cálculos, respectivamente.

$$N_{OLV} = (Ov5mL \times 425 / Va) \times 1.000$$

Em que:

N_{OLV} = Número de ovos no lavador;

Ov5mL = Quantidade de ovos em cinco mL;

Va = Volume da amostra;

425 = volume do lavador em litros;

1.000 = ajuste das unidades de medida de volume.

$$N_{OF} = N_{OLV} / N_{FD}$$

Onde:

N_{OF} = Número de ovos por fêmea;

N_{OLV} = Número de ovos no lavador;

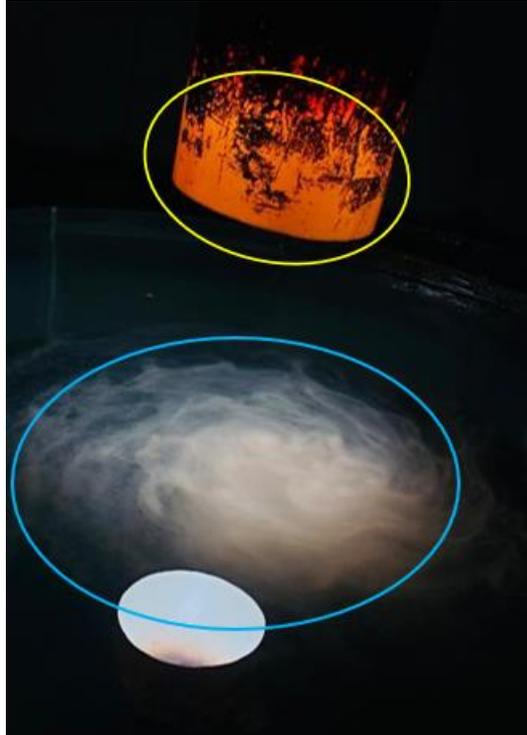
N_{FD} = Número de fêmeas que desovaram.

4.4.5 Taxa de eclosão e número de náuplios

No dia seguinte à transferência dos ovos para os *carboys* de eclosão, após aproximadamente 17 horas, ocorria a eclosão dos ovos, normalmente após sete horas de sua transferência para os *carboys* da sala de eclosão. Acima de cada um desses *carboys* era instalada

uma luz, estimulando a migração dos náuplios para a superfície da água, visto que os mesmos apresentam fototaxia positiva (Figura 8).

Figura 8 – Nuvem de náuplios (círculo azul) concentrados abaixo da luz (círculo amarelo).



Fonte: Elaborada pela autora.

Desse modo, com o auxílio de uma peneira, foi realizada a transferência dos náuplios em seu segundo estágio (N2) para os lavadores na sala de náuplios. Antes da transferência, de forma manual era realizado um movimento circular nos *carboys* para homogeneizar ovos e náuplios e assim realizar três amostragens de 50 mL para obter a taxa média de eclosão (T_E), a partir da seguinte fórmula.

$$T_E = Q_N / Q_{TNO} \times 100$$

Em que:

T_E = Taxa de eclosão;

Q_N = Quantidade de náuplios;

Q_{TNO} = Quantidade total de náuplios e ovos.

Com os dados obtidos da contagem acima citada, a partir do número de náuplios contados foi calculado o número de náuplios por *carboy* (Q_{NCb}) e estimado o número de náuplios por fêmea (Q_{NF}), utilizando respectivamente, as seguintes equações:

$$Q_{NCb} = Q_{NCt} \times 2.700 / 50 \times 1.000$$

Onde:

Q_{NCb} = Quantidade de náuplios no *carboy*;

Q_{NCt} = Quantidade de náuplios contados;

2.700 = volume em litros do *carboy*;

50 = volume amostrado;

1.000 = conversão das unidades de medida.

$$Q_{NF} = Q_{NCt} / N_{FD}$$

Em que:

Q_{NF} = Quantidade de náuplios por fêmea;

Q_{NCb} = Quantidade de náuplios no *carboy*;

N_{FD} = Número de fêmeas que desovaram.

4.5 Análises macroscópicas, somáticas e histológicas

Após serem pesadas (peso úmido) e terem a hemolinfa coletada, as fêmeas foram dissecadas com auxílio de pinça e tesoura para remoção do hepatopâncreas, gônadas e intestino. As fêmeas de cada tratamento, em cada um dos pontos de coleta foram analisadas macroscopicamente quanto ao: peso, grau de maturação através de observação visual do animal vivo, conforme usualmente praticado no setor onde se realizou o experimento e grau de maturação após dissecada, conforme tamanho e preenchimento gonadal.

4.5.1 Índices gonadossomático e hepatossomático

Ovários e hepatopâncreas foram pesados (peso úmido) após coleta para calcular os índices gonadossomáticos (I_{GS}) e hepatossomáticos (I_{HS}), obtidos através da razão entre o peso das gônadas ou hepatopâncreas e o peso total do corpo do animal, aplicando as seguintes equações, respectivamente.

$$I_{GS} = (P_G / P_A) \times 100$$

$$I_{HS} = (P_{HP} / P_A) \times 100$$

Sendo:

IGS = Índice gonadossomático;

P_G = Peso da gônada;

P_A = Peso do animal;

IHS = Índice hepatossomático;

P_{HP} = Peso do hepatopâncreas.

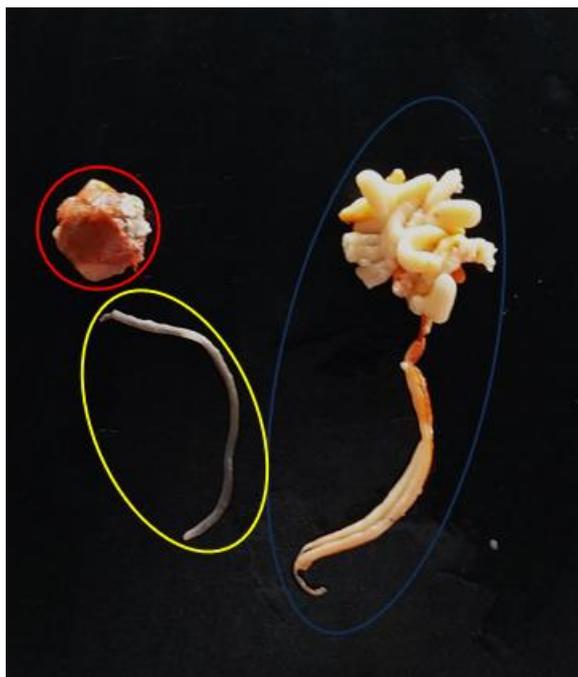
Os índices foram comparados entre os estágios de maturação para constatar se há relação entre os mesmos, bem como avaliar se difere entre os tratamentos.

4.5.2 Análises histológicas

Ovários, hepatopâncreas e intestinos foram fixados através de imersão em solução de Davidson AFA (ácido acético glacial (11,5%), formalina (22%), álcool etílico 95% (33%) e água destilada (33,5%)) e mantidos em frascos separados por animal. A quantidade de fixador utilizado correspondeu a um volume 10 vezes maior do que o volume da amostra.

Após 16-24 horas de fixação (Figura 9), os tecidos foram lavados com álcool 70% e armazenados em álcool de mesma concentração para serem processados posteriormente. Em laboratório, as amostras passaram por tricotomia (cortes menores de aproximadamente 1 a 2 centímetros, para serem acondicionados em histocassetes). Em seguida foram processadas passando por desidratação em séries crescentes de álcoois com duração de 1 hora cada: 1 banho em etanol 70%; 2 banhos em etanol 80%; 2 banhos em etanol 95%; 3 banhos em etanol 100%. Após desidratação, os tecidos passaram por diafanização em 2 banhos de xilol, para em seguida serem infiltrados por parafina líquida em dois banhos. Cada banho teve duração de uma hora. Depois da infiltração os tecidos foram emblocados com parafina, posteriormente cortados em micrótomo na espessura de 5 µm e submetidos à coloração com hematoxilina–eosina para serem examinados por microscopia de luz (BELL; LIGHTNER, 1988).

Figura 9 – Ovários (azul), intestino (amarelo) e hepatopâncreas (vermelho) fixados com solução de Davidson.



Fonte: elaborada pela autora.

A nível histológico, os estágios de desenvolvimento gonadal foram determinados conforme a abundância relativa do tipo mais avançado de ovócito no ovário, e foram classificados em: imaturo; em desenvolvimento inicial (I); desenvolvimento avançado (II); e maduro (III), de acordo com a figura classificatória apresentada a seguir na seção de resultados (Figura 13), construída com base em classificações adotadas por Craveiro (2018), Bernabé *et al.* (2022) e Craveiro *et al.* (2022).

Foi construído um quadro descritivo de classificação dos estágios gonadais (Figura 15) baseado na observação macroscópica do animal inteiro, de suas gônadas dissecadas e dos resultados da observação histológica, adaptadas de bibliografia disponível (BELL; LIGHTNER, 1988; SILVA *et al.*, 2016; CRAVEIRO, 2018, BERNABÉ *et al.*, 2022; CRAVEIRO *et al.*, 2022) e apoiadas no conhecimento prático adquirido e empregado no setor onde se realizou o experimento. As definições foram feitas levando em consideração as características observadas com maior frequência para cada um dos estágios.

No hepatopâncreas foram observados os tipos celulares predominantes, analisando se há alguma relação entre os aspectos observados e os estágios de maturação. No intestino foram levados em consideração a integridade do órgão, seus tipos celulares e a presença de vilosidades. Em todos os tecidos analisados foram observadas a integridade do mesmo, as estruturas e tipos celulares dominantes, bem como observado se há diferenças entre os tratamentos (BELL; LIGHTNER, 1988).

4.6 Contagem total de hemócitos

Para a coleta de hemolinfa, a região abdominal de cada fêmea foi higienizada com papel absorvente embebido com álcool 70%. Entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal foram coletados 100 µL de hemolinfa, utilizando uma seringa estéril de 1 mL com agulha hipodérmica de 25 x 0,7mm contendo 300 µL de solução isotônica anticoagulante SIC EDTA (NaCl 450 mM, KCl 10 mM, HEPES 10 mM, EDTA 10mM). A hemolinfa coletada foi transferida para tubo estéril e em seguida contada em câmara de *Neubauer* sob microscópio para determinar a quantidade total de hemócitos, seguindo os passos abaixo, e descrito na equação abaixo e ilustrado na Figura 9:

- 1 - Foram contados os 4 quadrantes externos (A,B,C,D) (Figura 10);
- 2 - O valor obtido foi somado e o total dividido por 4 para obter a média;
- 3 - A quantidade média foi multiplicada pela profundidade (10) e diluição (3);
- 4 - Obteve-se o valor total de células por mm³.
- 5 - Para calcular a quantidade de células por mL, o valor foi multiplicado por 1.000.

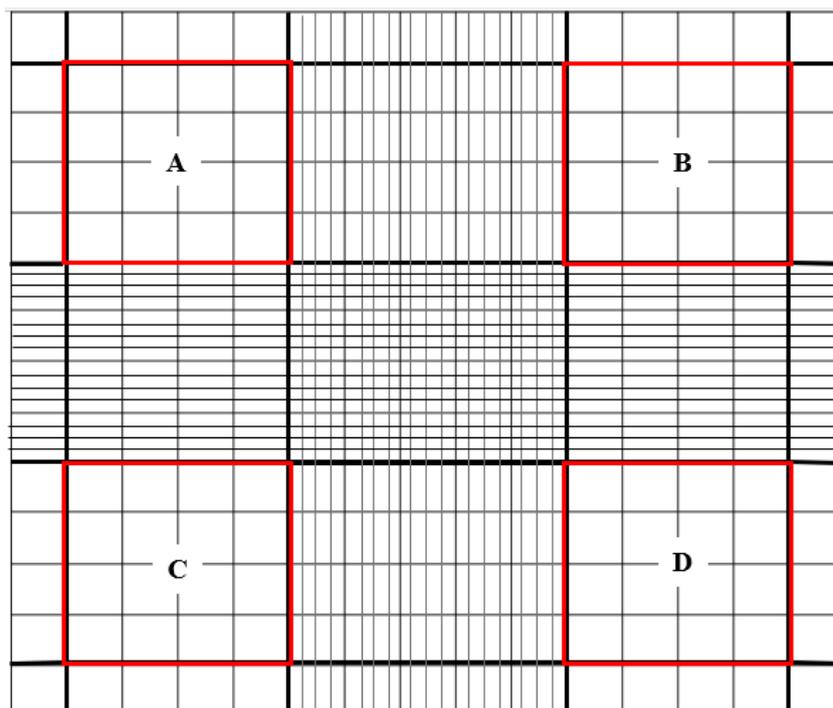
$$\text{Cel/mL} = ((A+B+C+D)/4) \times 10 \times 3 \times 1000$$

Sendo:

Cel/mL = Quantidade de células por mililitro;

$A+B+C+D/4$ = Média dos quadrantes externos.

Figura 10 – Desenho esquemático da câmara de *Neubauer* com destaque para os quadrantes utilizados para a contagem.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 Ganho de peso

O acompanhamento do ganho de peso se deu por meio da realização de biometrias semanais, onde cinco fêmeas de cada tanque foram selecionadas aleatoriamente e pesadas, gerando um peso médio por tanque e por tratamento, tornando possível descobrir o ganho de peso (GP) a partir da seguinte equação:

$$GP = P_F - P_I$$

Onde:

G_P = Ganho de peso;

P_F = Peso final;

P_I = Peso inicial.

4.8 Expressão de genes

Para análises da expressão gênica, os tecidos utilizados foram hepatopâncreas e ovários. Os mesmos foram coletados e mantidos em Trizol (Invitrogen®) até o momento da extração, na proporção de 50 a 100 mg de tecido para 500 μ L de Trizol.

O material coletado conservado sob congelamento a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi descongelado naturalmente em temperatura ambiente para realização da extração de RNA com Trizol (Invitrogen®) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, foi adicionado $100\text{ }\mu\text{L}$ de clorofórmio, a seguir agitando-as vigorosamente no vortex. Em seguida foram mantidas a temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a $12.000\text{ g}/15\text{ min}/4^{\circ}\text{C}$ para a separação de fases e transferência da fase superior (RNA total) para um novo tubo contendo $100\text{ }\mu\text{L}$ de álcool isopropílico. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 30°C , e centrifugadas a $12.000\text{ g}/10\text{ min}/4^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi removido por inversão, permanecendo o *pellet*, que foi lavado com etanol 75%, mesclado no vórtex e centrifugado a $7.500\text{ g}/5\text{ min}/4^{\circ}\text{C}$. O etanol foi descartado e os tubos invertidos sob um papel toalha para secagem em temperatura ambiente.

O RNA total extraído foi eluído em $40\text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura (Invitrogen®) e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 da ThermoFisher Scientific. As amostras de RNA foram padronizadas para a concentração de $100\text{ ng}/\mu\text{L}$. Foram feitos *pools* das amostras, onde cada três amostras de RNA padronizado deram origem a um *pool*. Cada um desses *pools* corresponde a RNA extraído de tecidos de três animais de um mesmo tanque e de um mesmo tratamento no mesmo ponto de coleta, exemplificando: RNA extraído e padronizado de 3 hepatopâncreas de 3 dos 9 animais coletados do tratamento controle na coleta 1 originaram 1 *pool*. O mesmo foi feito para ambos os tecidos, tratamentos e coletas. Cada coleta gerou 3 *pools* de cada um dos tecidos por tratamento.

Os *pools* de RNA foram tratados com DNase I (Invitrogen™), conforme recomendações do fabricante, para eliminação de DNA residual e purificação do RNA extraído. Após tratamento com a enzima, foi sintetizado o cDNA utilizando o *kit* High Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies®) seguindo as instruções do fabricante.

Os genes selecionados para expressão estão listados na Tabela 4. A análise dos mesmos foi feita através de PCR quantitativa em Tempo Real, utilizando o reagente *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix – UDG* (Invitrogen®), na plataforma ABI 7500 Real Time Systems (Applied Biosystems®). Como genes de referências, foram utilizados a β -actina e o *Fator de Elongação 1 α* (*EF-1 α*), através da média geométrica dos seus valores de C_T (LIANG *et al.*, 2019).

As reações foram realizadas em volume final de $10\text{ }\mu\text{L}$, sendo $5\text{ }\mu\text{L}$ de *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen®), $0,3\text{ }\mu\text{L}$ ($10\text{ }\mu\text{M}$) de cada primer, $0,2\text{ }\mu\text{L}$ do corante ROX, $1\text{ }\mu\text{L}$ de cDNA e $3,2\text{ }\mu\text{L}$ de água ultrapura (Invitrogen®). A termociclagem ocorreu em etapas de 2 min a 50°C , 2 min a 95°C , e 40 ciclos de 15 s a 95°C e 30 s a 60°C ; e

para maior confiança dos dados, as reações aconteceram em duplicata e validadas apenas quando a média dos CT de mesma amostra apresentou desvio padrão $\leq 0,3$.

A eficiência de amplificação dos *primers* selecionados foi determinada e a especificidade das amplificações examinadas através da análise das curvas de *melting*. Os valores de Ct médios obtidos foram normalizados e convertidos para a forma linear pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde Ct é o ciclo de quantificação da PCR em tempo real, no qual a amplificação atinge a fase logarítmica, e delta Cq é a diferença de expressão entre o gene alvo e controle endógeno de uma determinada amostra (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 4 – Sequências dos *primers* utilizados nas análises de expressão gênica.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Referência
β -actin-F	GACCGAGGCTCCCCTTCAA	Feijó <i>et al.</i> (2016)
β -actin-R	TCTCGAACATGATCTGTGTGTCAT	
Efl α -F	CCTATGTGCGTGGAGACCTTC	Liang <i>et al.</i> (2019)
Efl α -R	GCCAGATTGATCCTTCTTGTGGAC	
Hsp70-F	CCGGAGATAGAACGGTTCAGTG	Wu <i>et al.</i> (2008)
Hsp70-R	CGATAATTCTCCCAACACCTG	
proPO-F	CGGTGACAAAGTTCCTCTTC	Wang, Chang e Chen (2007)
proPO-R	GCAGGTCGCCGTAGTAAG	
SOD-F	TGGAGTGAAAGGCTCTGGCT	Gomez-Anduro <i>et al.</i> (2006)
SOD-R	ACGGAGGTTCTTGTACTGAAGGT	
Lipase-F	ACTGTCTCCTCTGCTCGTC	Zhao <i>et al.</i> (2007)
Lipase-R	ATGGTTTCTGGAATAGGTGTTT	
Tripsina-F	CGGAGAGCTGCCTTACCAG	Klein <i>et al.</i> (1996)
Tripsina-R	TCGGGGTTGTTTCATGTCCTC	
Vtg-F	AATACAAGAACGTGAGGGATAGGAA	Raviv <i>et al.</i> (2006)
Vtg-R	AGGCAATCACACTTGTATATTTGTATTTT	
rVtg-F	AGACGCTACGCTTCGCCAAC	Ventura-López <i>et al.</i> (2017)
rVtg -R	CGGCACGTGCTATCAGTTT	
mprg-F	ACTTCGTTCCCGCGCTGTAT	Ventura-López <i>et al.</i> (2017)
mprg-R	CGCAGGAGAAGGTGTGAGCA	

Fonte: Elaborada pela autora.

4.9 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa OriginPro (Versão 2017).

4.9.1 Desempenho reprodutivo

Para a avaliação do desempenho reprodutivo, foram considerados os parâmetros: (a) Taxa de cópula, (b) Taxa de desova, (c) Taxa de eclosão, (d) Número de abortos (e) Número de ovos e (f) Número de náuplios. Todos os dados, por parâmetro, foram organizados, considerando-se os grupos “Controle” e “Óleo”. A comparação entre os dois grupos foi realizada por mês e no total do experimento. Para isso, foi utilizado o teste t de Student bilateral, considerando-se um nível de significância (α) de 5%.

4.9.2 Contagem de Hemócitos, Índices Gonadossomáticos (IGS) e Hepatossomáticos (IHS)

Os dados de contagem de hemócitos, IGS e IHS foram organizados considerando-se os grupos “Controle” e “Óleo”. A comparação entre os dois grupos foi realizada por coleta e por média geral das coletas. Para isso, foi utilizado o teste t de Student bilateral, considerando-se um nível de significância (α) de 5%.

4.9.3 Ganho de peso

Para avaliação estatística dos dados de ganho de peso foi utilizada ANOVA-*One-way* considerando-se os grupos (Controle ou Óleo), a um nível de significância (α) de 5%.

4.9.4 Expressão Gênica

Os dados de expressão foram calculados por tecido (Hepatopâncreas e Ovário), considerando-se o grupo (Controle ou Óleo), por coleta (no total de 6) e no total do experimento. Para isso, foi utilizado o teste t de Student bilateral considerando-se um nível de significância (α) de 5%.

5 RESULTADOS

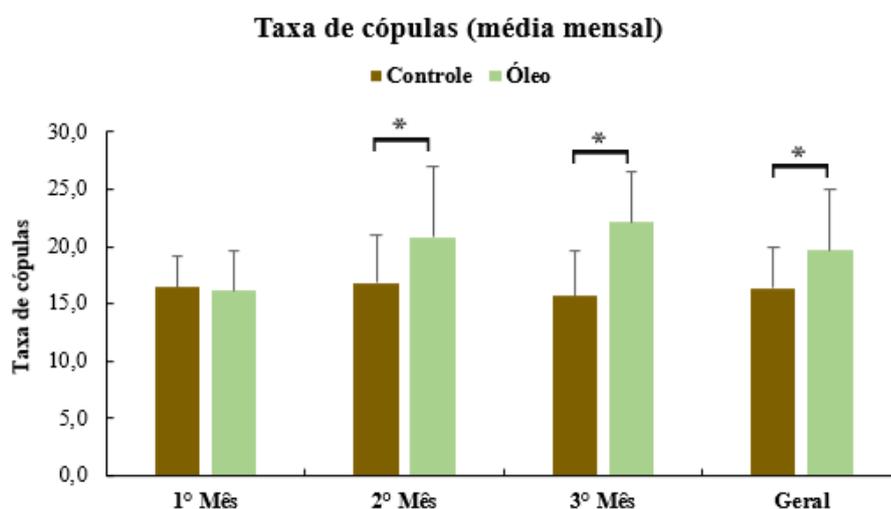
5.1 Desempenho reprodutivo

5.1.1 Taxa de cópula

A taxa de cópula diária, representada em porcentagem e calculada com base no número de fêmeas totais do tratamento e o número de fêmeas transferidas para o setor de desova variou entre 6,0 e 31,6% ao longo do experimento.

No primeiro mês em produção, as taxas médias foram iguais para ambos os tratamentos (16%). No mês seguinte, a taxa de cópula foi superior no grupo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco (21%). Já o controle apresentou taxa média de cópula de 17%. No terceiro mês em produção, os tratamentos novamente diferiram entre si, com o grupo óleo superando o controle, apresentando taxas de cópulas de 22% e 16%, respectivamente. A média geral entre os tratamentos foi significativamente diferente, com 20% e 16% de cópulas para as fêmeas alimentadas com dieta suplementada com óleo de coco e as do controle, respectivamente (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Média mensal e geral das taxas de cópulas diárias ao longo dos três meses de experimento.



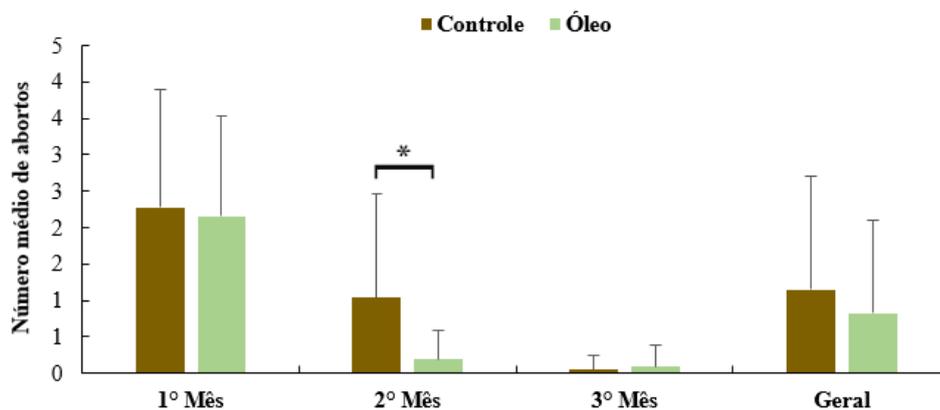
Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.2 Número de abortos

O número médio de abortos diários variou entre zero e sete ao longo do experimento, com uma média geral ao final do experimento igual a um para ambos os tratamentos. Apenas no segundo mês em produção houve diferença significativa no número de abortos, com o controle apresentando média igual a 1,0 e o grupo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco, média 0,2 (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Média mensal do número diário de abortos e desovas não concluídas.

Número de abortos/desovas não concluídas (média mensal)



Fonte: Elaborado pela autora.

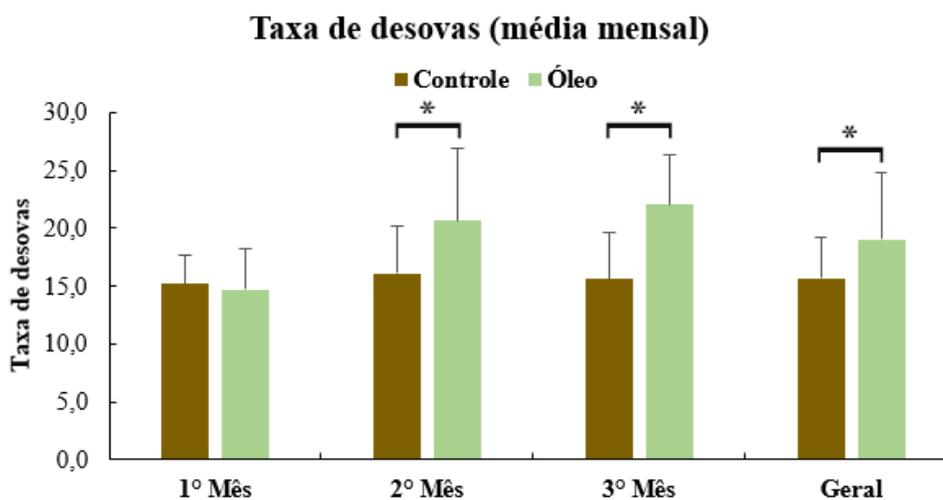
5.1.3 Taxa de desovas

A diferença entre o número de cópulas e o número de abortos/fêmeas que não desovaram resulta no número efetivo de fêmeas que desovaram diariamente, e consequentemente, nas taxas de desovas, expressas no gráfico abaixo (Gráfico 3).

As taxas médias de desova diária variaram entre 4,7 e 31,6%. Com exceção do primeiro mês em produção, as taxas médias de desovas foram maiores para o tratamento com óleo quando comparadas ao controle. Assim como para a taxa de cópulas, no tratamento controle temos uma maior estabilidade na taxa de desovas ao longo do tempo, com a taxa média mensal variando entre 15 e 16%.

Enquanto as fêmeas alimentadas com ração suplementada com 2,5% de óleo de coco apresentaram uma taxa de desova crescente, atingindo seu pico no terceiro mês em produção, com uma taxa média de 22% (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Média mensal e geral da porcentagem (%) diária de fêmeas que desovaram diariamente ao longo dos três meses de experimento.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.3.1 Quantidade de desovas por fêmea

Para o parâmetro quantidade de desovas por fêmea, os resultados aqui apresentados levaram em consideração apenas as fêmeas que sobreviveram até o final do experimento (3 meses em produção). Esse critério é importante, uma vez que reflete melhor a capacidade de cópula e desova da fêmea ao longo de um ciclo produtivo.

Considerando as fêmeas sobreviventes até o final do experimento, nota-se por meio da observação dos gráficos abaixo (4 e 5), que a maioria das fêmeas desovaram entre 11 e 20 vezes, em ambos os tratamentos.

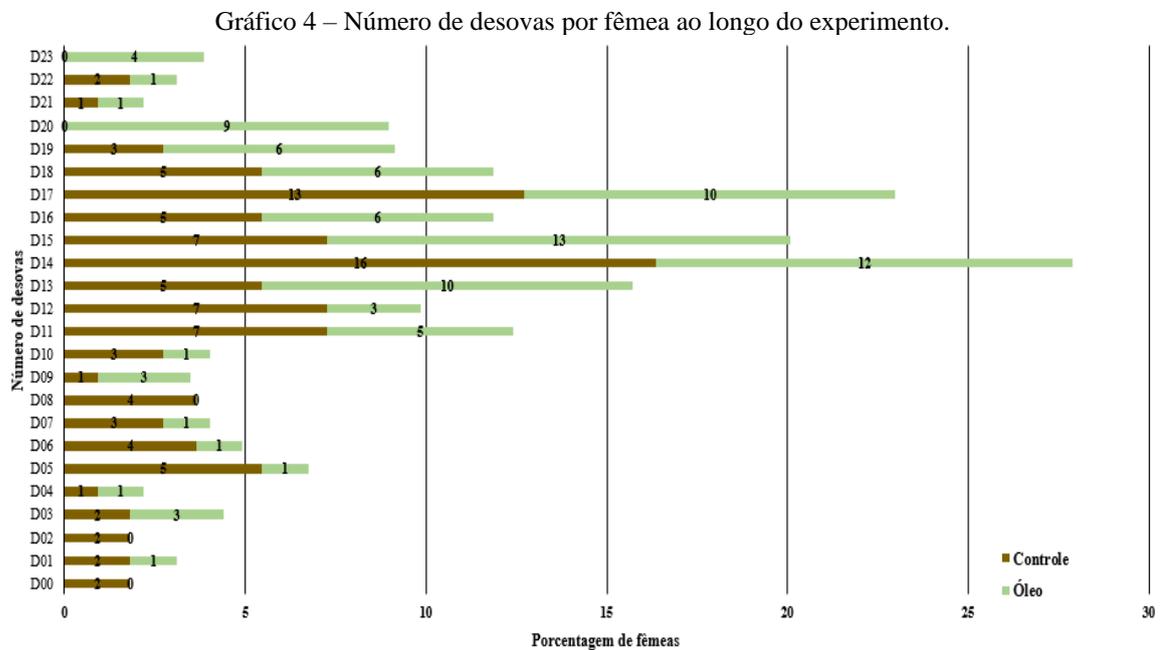
No Gráfico 4 temos uma distribuição mais detalhada que nos possibilita ver que o número de desovas mais representativo foi 14 vezes, aquele no qual está concentrado o maior número de fêmeas (27), representado por 16% de fêmeas do controle e 12% do grupo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco. Esse valor representa uma média aproximada de cinco desovas por fêmea no período de um mês. No entanto, conforme exposto no Gráfico 4, esse valor é variável, uma vez que existem fêmeas que não desovaram nenhuma vez em três meses de experimento, e algumas desovaram até 23 vezes, o que daria uma média mensal aproximada de oito desovas por mês para essas fêmeas de máximo potencial.

No controle, a média geral de desova por fêmea durante todo o período experimental foi de 12, enquanto para o grupo óleo foi 15, o que resultou em uma média mensal de três e quatro desovas por mês para cada fêmea no controle e no óleo, respectivamente.

Apenas no controle foram registradas fêmeas que não desovaram nenhuma vez, num total de duas. Nesse experimento notou-se que as fêmeas que mais desovaram o fizeram

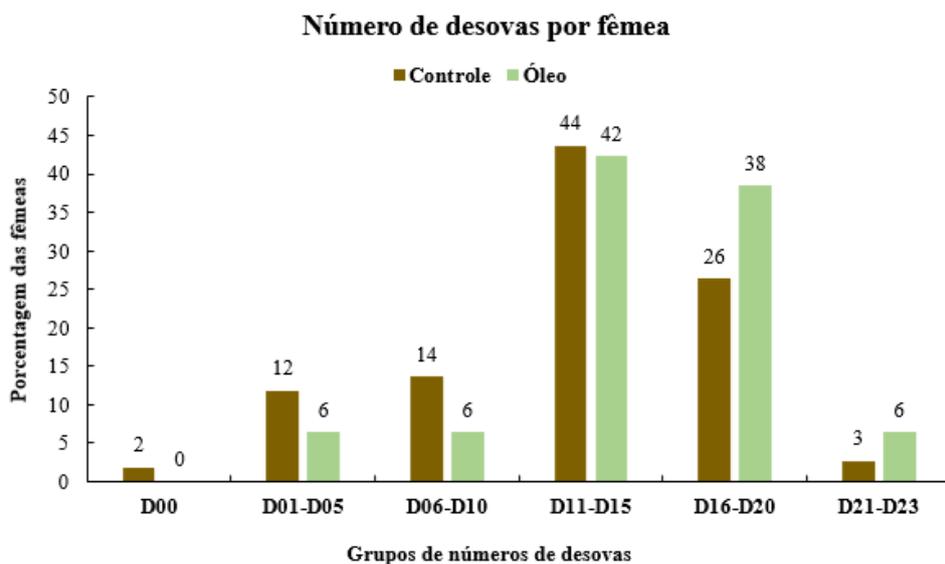
23 vezes, e todas elas pertencem ao grupo alimentado com ração suplementada com óleo de coco, representando 4% do total, equivalente a três fêmeas.

Ainda analisando os gráficos (4 e 5), constatamos que apenas 12% das fêmeas do grupo alimentado com ração contendo óleo de coco desovaram menos de 10 vezes, enquanto nessa mesma faixa de número de desovas, o controle concentrou 28% de suas fêmeas. Em ambos os tratamentos, as categorias de número de desovas onde se observa o maior número de fêmeas são as de 11 a 15 desovas e 16 a 20 desovas. Para essas duas categorias, o controle concentrou 70% de suas fêmeas e o grupo óleo 80%, o que nos leva a inferir que o óleo favorece o aumento da quantidade de desovas por fêmea.



Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 5 – Agrupamento em categorias da quantidade de desovas por fêmea.

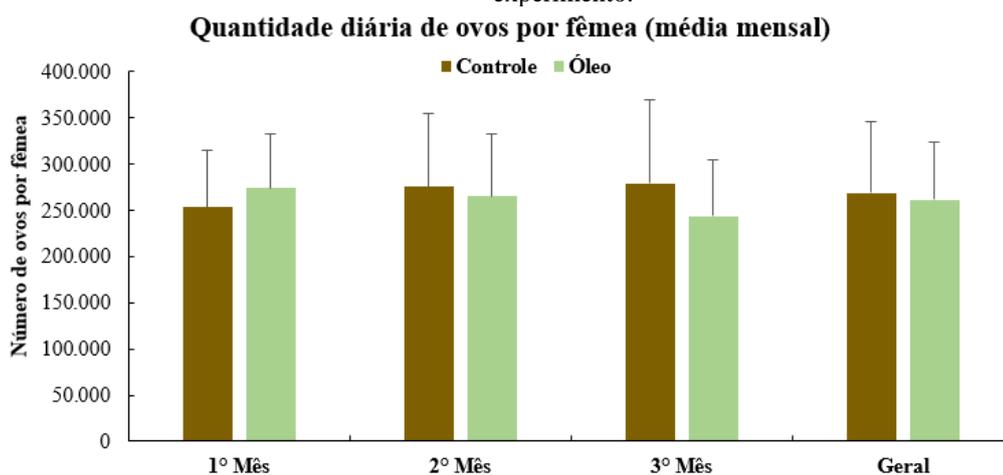


Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.4 Número de ovos

A quantidade média diária de ovos por fêmea variou entre 130.500 e 550.652. De modo geral e nas médias mensais não houve diferença significativa entre os tratamentos, com uma média geral de 269.079 ovos por fêmea no controle, e 261.542 no tratamento em que as fêmeas foram alimentadas com ração suplementada com óleo de coco (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Média mensal e geral da quantidade diária de ovos por fêmeas ao longo dos três meses de experimento.



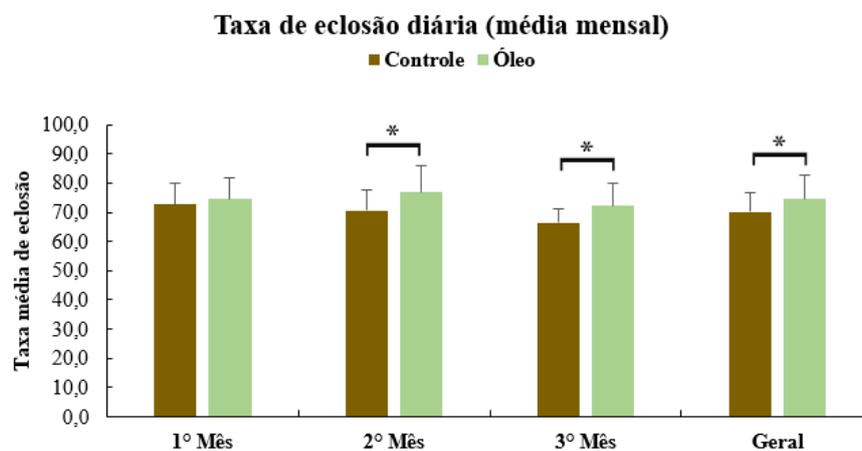
Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.5 Taxa de eclosão

Nesse estudo, a quantidade de ovos não foi influenciada pela adição de óleo à dieta dos reprodutores, no entanto as taxas de eclosão apresentaram diferenças significativas (Gráficos 7).

As taxas de eclosão diárias ao longo do experimento variaram entre 55,4% e 97,0%. Com exceção do primeiro mês em produção, nas demais médias mensais e geral, as taxas do tratamento com óleo foram superiores às do controle, que apresentou média geral de 70% de taxa eclosão, enquanto o grupo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco exibiu média de 74,6% (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Média mensal e total das taxas diárias de eclosão dos ovos por tratamento ao longo dos três meses de experimento.

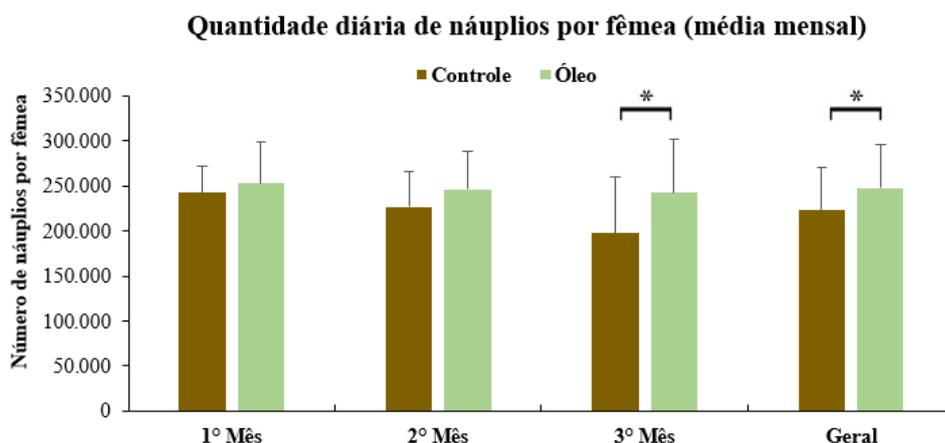


Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.6 Número de náuplios

Nos experimentos conduzidos utilizando óleo de coco na dieta de fêmeas de *P. vannamei*, tal quantidade variou entre 95.294 e 360.000 náuplios por fêmea. Analisando as médias mensais e geral, observa-se um maior número de náuplios por fêmea para os animais alimentados com óleo, diferindo estatisticamente no terceiro mês do experimento, em que o tratamento com óleo apresentou maior quantidade (242.762) que o controle (197.886). Foi também significativa a diferença na média geral entre os tratamentos, com 223.052 náuplios por fêmea por desova no controle, e 247.456 para os animais do tratamento com óleo (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Média mensal e geral da quantidade diária de náuplios por fêmea.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Análises macroscópicas e histológicas das gônadas

5.2.1 Análises macroscópicas

No presente estudo, uma diversidade de cores das gônadas foi registrada (Figura 11). No entanto, não foi possível observar correlação de cor com tratamento, pois as mesmas colorações foram registradas para ambos em diferentes pontos de coleta. O que se pôde observar é que estas variam desde transparente, esbranquiçada até diferentes tons de amarelo e mais raramente esverdeado ou uma tonalidade mais escura, conforme mostrado na figura abaixo. As cores se intensificam de acordo com o avanço da maturação gonadal. Fêmeas imaturas apresentaram gônadas transparentes, e conforme foram avançando no processo de maturação, passaram a exibir gônadas com coloração, que no estágio I geralmente foram esbranquiçadas à levemente amareladas. Nos estágios II e III predominou a coloração amarela, observada em diferentes tonalidades.

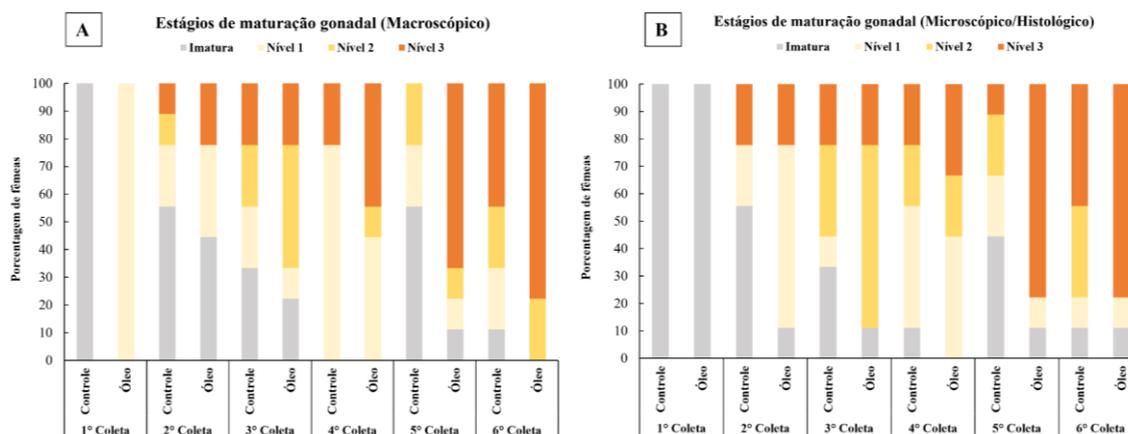
Figura 11 – Variações de coloração gonadal dos ovários de fêmeas coletadas aleatoriamente nos diferentes pontos de coleta (desde antes da ablação ao terceiro mês de experimento), no grupo controle e no das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco. Na figura, as fotos foram dispostas também aleatoriamente, sem considerar o tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora.

Conforme descrito no tópico 4.5, as fêmeas foram caracterizadas visualmente e também histologicamente, permitindo quantificar o número de fêmeas em cada um dos estágios nas diferentes coletas. As quantificações foram contabilizadas e comparadas graficamente. Os gráficos foram dispostos lado a lado intuitivamente para facilitar a visualização e comparação da maturação gonadal a nível micro e macroscópico, e assim atestar a confiabilidade e precisão da identificação visual do estágio de maturação das fêmeas (Figura 12).

Figura 12 – Estágios de maturação gonadal a nível macroscópico (A) e histológico (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

Como previsto, na primeira coleta, antes da ablação, a totalidade das fêmeas em ambos os tratamentos se encontravam imaturas. No entanto, na caracterização visual, as fêmeas do grupo óleo já apresentavam gônadas visivelmente mais desenvolvidas, espessas e com coloração mais forte que as do controle. Nas coletas após a ablação nota-se o aumento do número de fêmeas maduras e começando a maturar em ambos os tratamentos.

Na segunda coleta, quatro dias após ablação, o número de fêmeas imaturas do controle coincide em ambas as caracterizações (macro e microscópica), e ainda excede o de maduras, sendo também superior ao número de imaturas do grupo óleo. Nessa coleta, a nível histológico, um número maior de fêmeas foi detectado no grupo óleo em relação à análise macroscópica.

Na coleta três, referente ao tempo de uma semana em produção, novamente o número de imaturas do controle é igual em ambas as análises e superior ao do grupo óleo, que histologicamente apresenta 89% de fêmeas maduras, enquanto o controle tem 67%. Para o óleo, a análise visual diverge da histológica.

Na quarta coleta, que é referente ao primeiro mês em produção, 100% das fêmeas do tratamento em que as fêmeas foram alimentadas com dieta suplementada com óleo de coco estavam maduras, de acordo com as análises histológicas (Figura 12 B). Nas coletas quatro (um mês em produção), cinco (dois meses em produção) e seis (três meses em produção), são registrados tanto no controle quanto no grupos dos camarões alimentados com ração suplementada com óleo de coco, o maior número de fêmeas maturadas, e no nível máximo de maturação, exceto para o controle na quinta coleta, que demonstra um comportamento divergente nas duas formas de análise, com um número elevado de fêmeas imaturas.

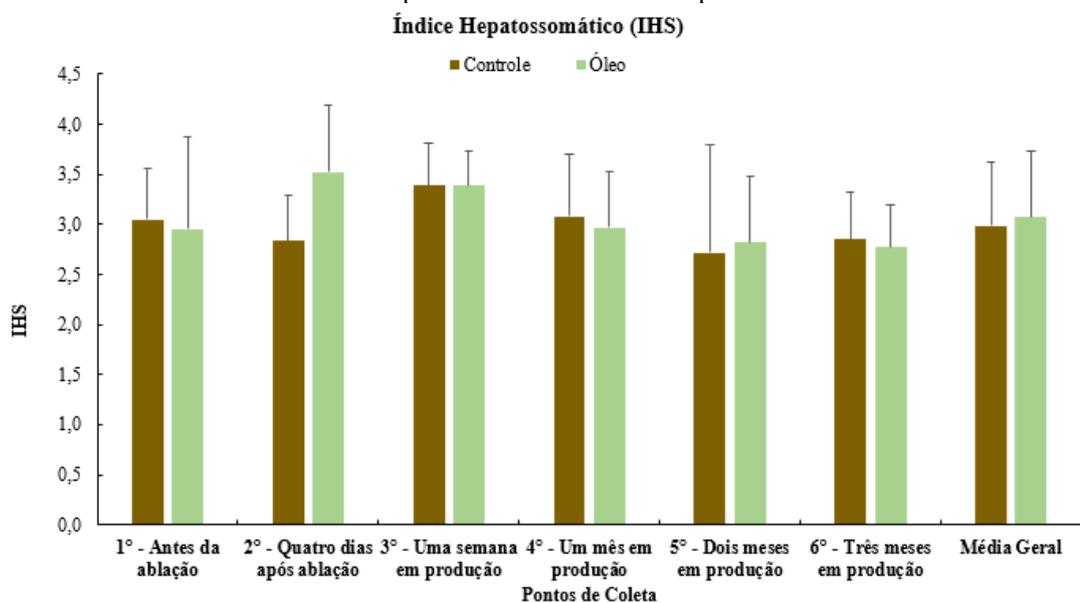
De modo geral, as divergências entre as formas de classificação são pequenas. Na primeira coleta, antes da ablação, as análises divergiram para o grupo alimentado com ração

suplementada com 2,5% de óleo de coco, tornando o resultado da análise visual superestimado em relação ao microscópico. O mesmo aconteceu para o controle na quarta coleta e na sexta para o grupo tratado com dieta suplementada com óleo. Com exceção desses três casos, as demais coletas demonstram que os resultados de classificação macroscópica são viáveis, rápidos e confiáveis, quando bem aplicados.

5.2.1.1 Índices gonadossomático e hepatossomático

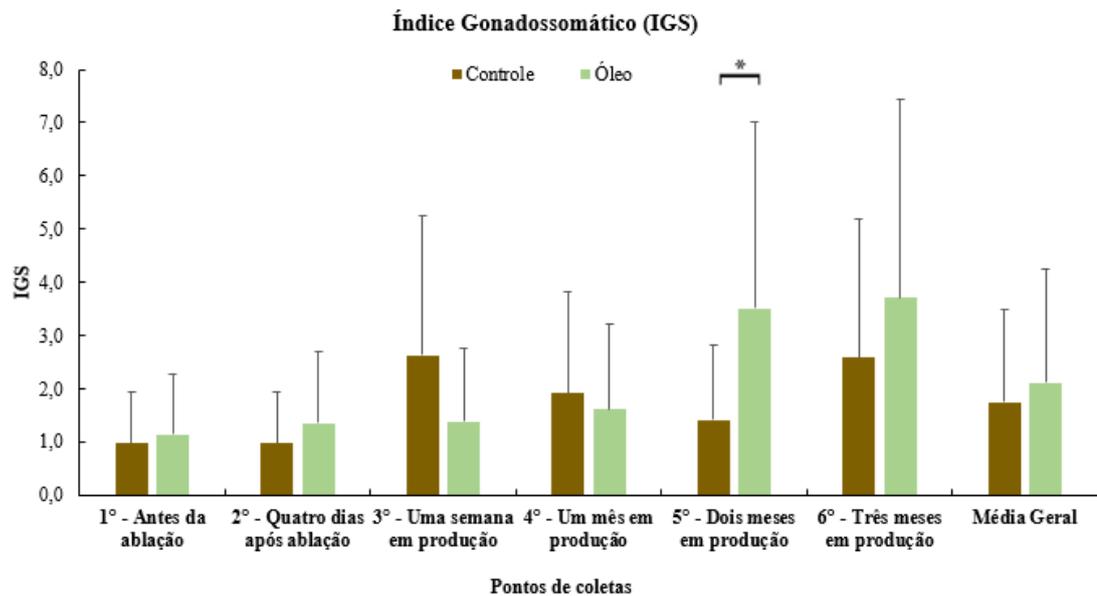
Os dados apresentados graficamente (Gráficos 9 e 10), foram gerados a partir das médias dos nove animais de cada tratamento por coleta. No presente estudo, os índices hepatossomáticos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos e entre os diferentes pontos de coleta ao longo do experimento (Gráfico 9). Já os índices gonadossomáticos só diferiram entre os tratamentos na quinta coleta, referente ao segundo mês em produção. (Gráfico 10).

Gráfico 9 – Média dos índices hepatossomáticos das fêmeas por coleta e tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 10 – Média dos índices gonadossomáticos das fêmeas por coleta e tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora.

Quando observadas individualmente, em muitas fêmeas foi possível notar uma relação inversamente proporcional entre os dois índices apresentados. Fêmeas imaturas normalmente apresentavam IHS maior que o IGS e fêmeas em estágio avançado de maturação ou maduras apresentaram IGS superior ao IHS. Exemplo disso é mostrado na tabela abaixo, construída com os dados das primeira e quinta coletas, em que essa relação pôde ser vista com maior clareza em grande parte das fêmeas coletadas (Tabela 5). Na tabela abaixo, entre as fêmeas da coleta um e cinco, há diferença de 80 dias.

Tabela 5 – Relação entre o peso das gônadas e hepatopâncreas.

	1° Coleta (Antes da ablação)				5° Coleta (2 meses em produção)			
	Controle		Óleo		Controle		Óleo	
	IHS	IGS	IHS	IGS	IHS	IGS	IHS	IGS
Fêmea 1	2,6	0,5	4,3	1,0	4,7	1,2	2,7	0,8
Fêmea 2	2,7	0,8	2,2	1,4	3,4	0,9	2,8	6,6
Fêmea 3	3,3	1,3	3,1	1,7	2,0	1,3	3,6	3,3
Fêmea 4	2,1	1,2	4,5	0,9	1,4	1,1	2,0	3,8
Fêmea 5	2,9	1,1	2,7	0,9	3,6	0,6	3,5	2,9
Fêmea 6	3,8	0,4	2,1	1,0	3,2	2,5	2,4	6,7
Fêmea 7	3,3	1,9	2,0	1,2	2,4	3,3	3,8	3,8
Fêmea 8	3,3	0,6	2,5	1,1	2,1	1,0	2,0	1,2

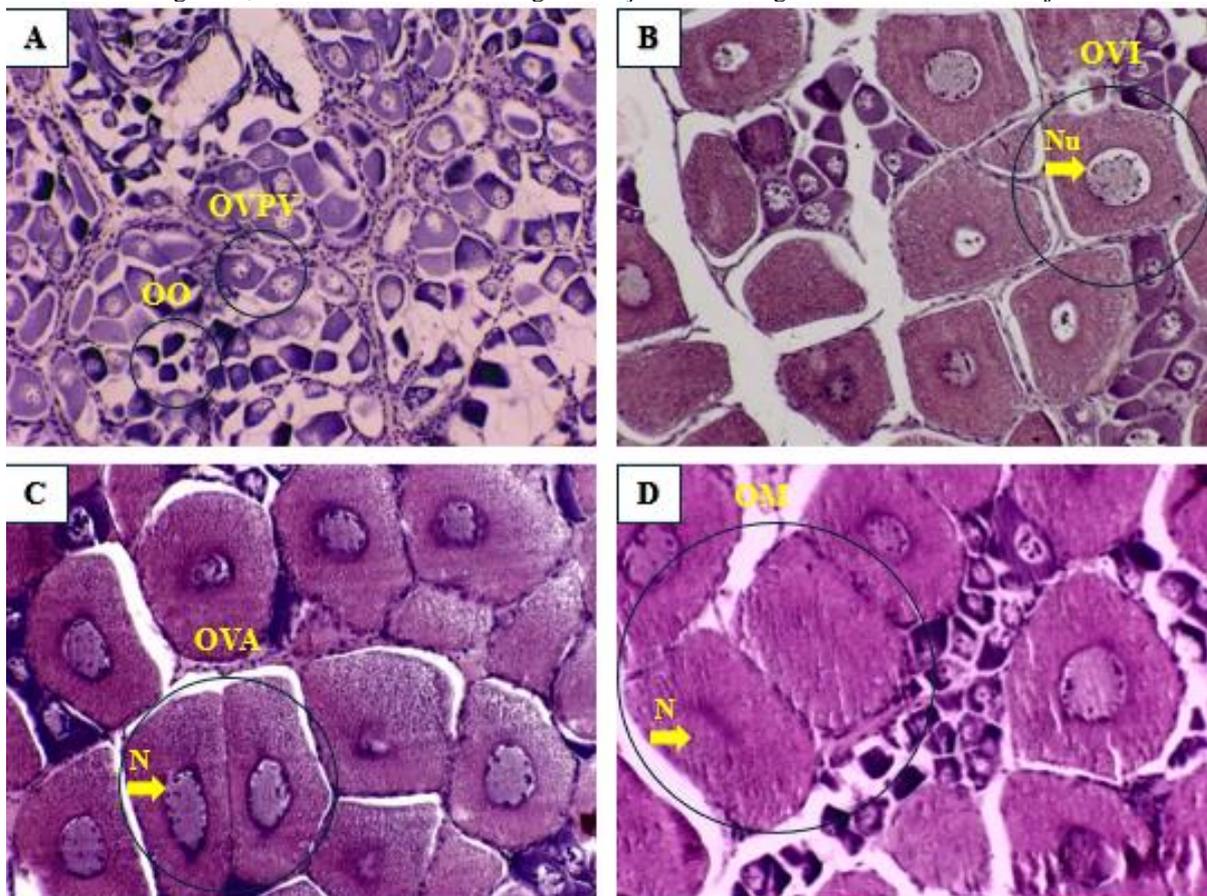
Fêmea 9	3,3	0,9	3,1	1,0	1,6	0,8	2,5	2,5
---------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2 Análises histológicas das gônadas

Na figura 13 é possível observar a caracterização dos estágios gonadais definidos e observados no presente estudo, classificados em: imaturo; em desenvolvimento inicial (I); desenvolvimento avançado (II); e maduro (III).

Figura 13 – Fotomicrografias de cortes histológicos de gônadas de fêmeas de *P. vannamei* corados com Hematoxilina e Eosina, enfatizando a classificação dos estágios de desenvolvimento gonadal. (A) representa o estágio imaturo com predominância de ovócitos pré-vitelogênicos; (B) em desenvolvimento com ovócitos iniciando a vitelogênese; (C) estágio avançado de desenvolvimento gonadal com prevalência de ovócitos em vitelogênese avançada; (D) estágio maduro destacando ovócitos maduros. As siglas na imagem significam: **N** – Núcleo; **Nu** – Núcleo; **OO** – Oogônias; **OVPV** – Ovócitos pré-vitelogênicos; **OVI** – Ovócitos em estágio inicial de vitelogênese; **OVA** – Ovócitos em estágio avançado de vitelogênese. Aumento com objetiva: 10x.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na primeira coleta, referente ao tempo de dois dias antes da ablação, as fêmeas do controle e do grupo alimentado com ração suplementada com ração contendo óleo de coco,

encontravam-se imaturas. A figura 13 A e B confirmam essa informação, a partir da predominância de células pré-vitelogênicas presentes na totalidade das fêmeas analisadas.

Em nosso experimento, a segunda coleta, realizada quatro dias após a ablação, marcou o início da maturação (Figura 14 C e D). Nesse estágio começam a surgir ovócitos em vitelogênese inicial, mas ainda podem ser visualizados ovócitos pré-vitelogênicos. Diferenças foram notadas entre os tratamentos. Nas fêmeas alimentadas com ração contendo óleo de coco, o número de fêmeas imaturas foi menor que no controle (11 e 56%, respectivamente). Maiores quantidades de oócitos em vitelogênese foram observados nos animais tratados com óleo, além de nitidamente ser perceptível o maior tamanho celular.

Na terceira coleta, referente à primeira semana em produção, nos dois tratamentos, a maioria das fêmeas encontravam-se no estágio dois de maturação. No controle, 33% das fêmeas estavam nesse estágio, e no óleo, 67%. Nesse estágio, já podemos observar células com vitelogênese completa, o que caracteriza desenvolvimento avançado do processo de maturação (Figura 14 E e F).

No primeiro mês completo em produção, quarta coleta, enquanto 11% das fêmeas do controle estavam imaturas, todas as fêmeas do grupo alimentado com ração suplementada com óleo de coco estavam maduras ou em processo de maturação. Nos dois tratamentos, a maior parte das fêmeas (44%) estavam no estágio inicial de maturação. Essa informação, vista isoladamente, pode trazer questionamento, se não analisada de forma prudente, técnica e racional, levantando a hipótese de que as fêmeas regrediram seu estágio de maturação. No entanto, o que de fato ocorre é que as fêmeas maturam cerca de quatro a cinco vezes ao mês, conforme os dados levantados no próprio estudo.

Desse modo, como as amostragens eram realizadas aleatoriamente, qualquer fêmea em qualquer um dos estágios de maturação poderia ser coletada. As nove fêmeas retiradas do tanque em cada coleta são um representativo da porcentagem estimada de fêmeas em cada um dos estágios ao longo dos meses em produção.

Ainda sobre a quarta coleta (primeiro mês em produção), a maior parte das fêmeas, que se encontravam em estágio inicial ou avançado de maturação e maduras, apresentaram a predominância de células em vitelogênese inicial, avançada e completa, respectivamente.

Na coleta cinco, que representa o segundo mês em produção, diferenças nítidas foram observadas entre as fêmeas dos dois tratamentos. No controle, 44% das fêmeas estavam imaturas e no grupo alimentado com ração suplementada com óleo apenas 11%. As demais fêmeas estavam em maturação inicial ou avançada e maduras. Dessas, no tratamento dos camarões alimentados com ração suplementada com óleo, as coletas cinco e seis (segundo e

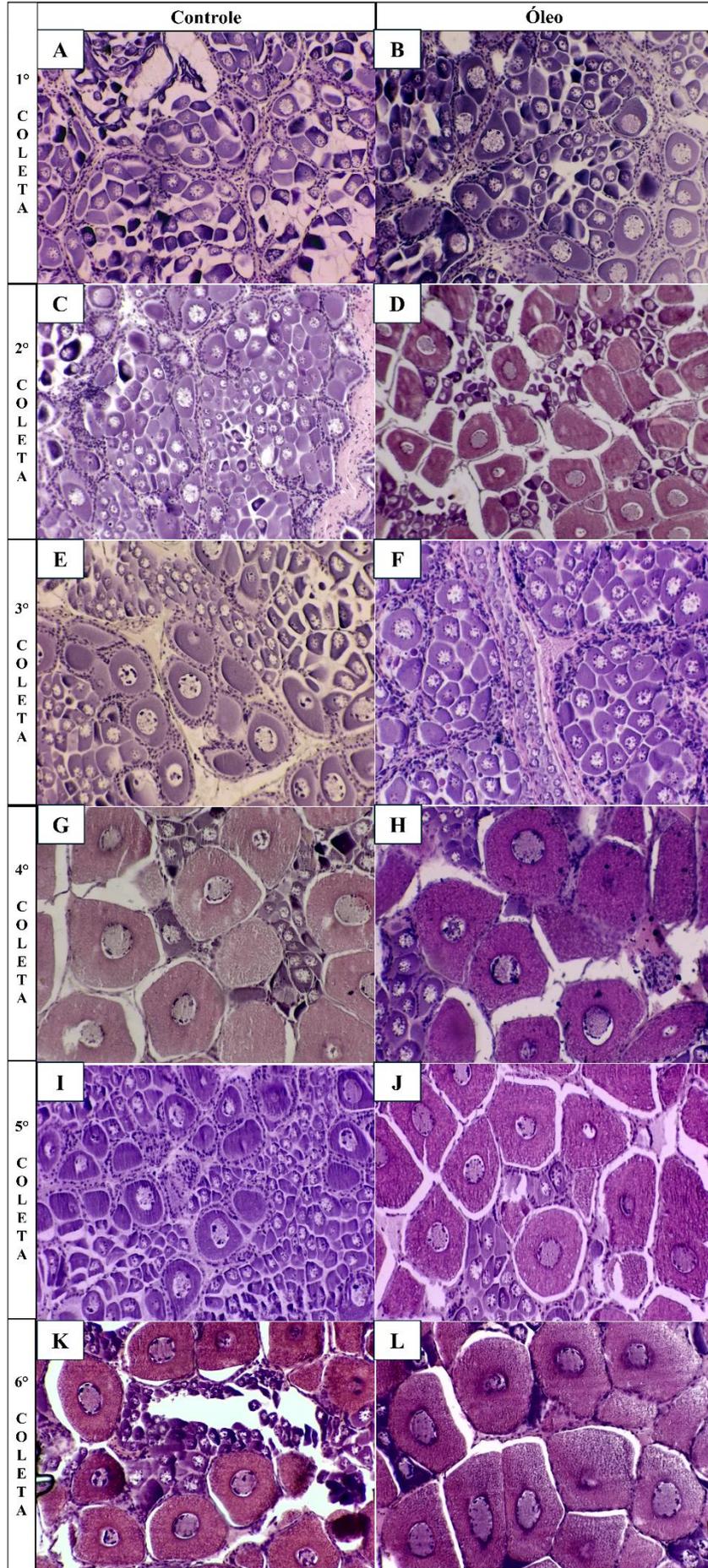
terceiro mês em produção, respectivamente) foram as que maior porcentagem de fêmeas no estágio máximo de maturação foram registradas (78%). Esse valor é superior ao do controle, que apresentou 11% e 44% de suas fêmeas em estágio III, nas quinta e sexta coletas, respectivamente. Esses dados sugerem que o óleo ajuda no desenvolvimento gonadal das fêmeas, mostrando resultados mais visíveis a partir do segundo mês em produção.

Esses dados histológicos esclarecem e somam-se aos dados de desempenho zootécnico, como taxas de cópulas, desovas, eclosão e número de náuplios, que apresentaram resultados superiores a partir do segundo mês em produção para as fêmeas alimentadas com ração contendo óleo de coco.

A última coleta, referente ao terceiro mês em produção, mostra para ambos os grupos, os maiores níveis de maturação nas fêmeas amostradas. No controle, 44% das fêmeas e no grupo alimentado com ração suplementada com óleo, 78% das fêmeas maduras. Como pode ser observado na Figura 14 K e L, ovócitos maduros predominam em ambos os tratamentos.

Em suma, com os resultados de todas as fêmeas amostradas em todos os pontos de coletas, as análises histológicas das gônadas revelaram uma porcentagem 1,3 vezes maior de fêmeas maduras ou em maturação quando alimentadas com dieta suplementada com óleo de coco. No controle, 68,8% das fêmeas analisadas e no grupo alimentado com ração suplementada com óleo de coco, 91,1% das fêmeas.

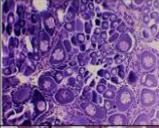
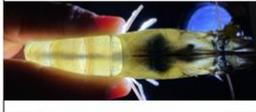
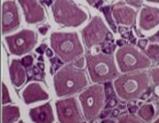
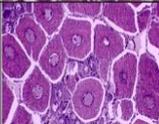
Figura 14 – Fotomicrografias de cortes histológicos das gônadas das fêmeas do grupo controle e do grupo alimentado com dieta suplementada com óleo de coco, coletadas ao longo de todo o experimento. Aumento com objetiva: 10x.



Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 15 apresenta o quadro resumo descritivo e explicativo, correlacionando todos os aspectos observados, citados na metodologia, utilizados para identificação e classificação do estágio de maturação gonadal das fêmeas reprodutoras de *P. vannamei*.

Figura 15 – Classificação macro e microscópica dos estágios de maturação gonadal de fêmeas reprodutoras de *P. vannamei* cultivadas.

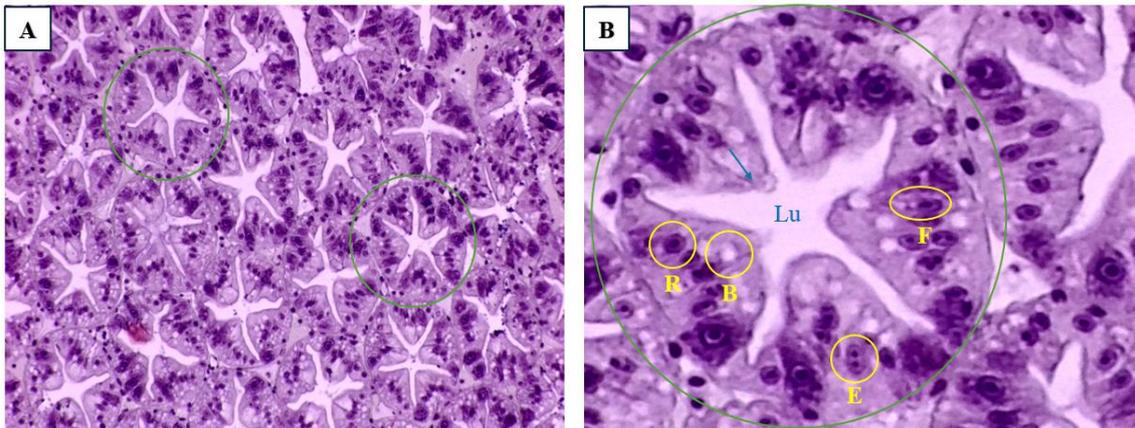
Estágios	Aspectos visuais das gônadas no animal vivo	Descrição dos aspectos visuais macroscópicos	Aspectos visuais das gônadas dissecada	Descrição histológica	Observações histológicas
Imatura		O ovário não pode ser visualizado através do exoesqueleto, pois normalmente é transparente e de pequena espessura.		Predominam as oogônias e ovócitos pré-vitelogênicos, estes possuem citoplasma mais desenvolvido que oogônias e núcleo maior em relação ao citoplasma, podendo apresentar nucléolos na periferia do núcleo.	
Estágio 1 Início da maturação		É pouco visível através do exoesqueleto na posição do cefalotórax e mais visível na região dorsal, se tornando mais espessa que no estágio anterior.		Ovócitos basófilos (oogônias e pré-vitelogênicos) estão presentes na zona germinativa. Aparecimento de células em vitelogênese lipídica inicial, evidenciada pela coloração rosa.	
Estágio 2 Maturação avançada		A espessura aumenta e a coloração é mais forte, tornando-se mais nítida, sendo facilmente visualizados todos os lóbulos do ovário, podendo ainda apresentar falha no preenchimento em alguns dos segmentos iniciais.		As células mais desenvolvidas deste estágio se encontram em vitelogênese completa, evidenciada pela pigmentação rosa mais escuro. Células foliculares apresentam formato achatado e circundam os ovócitos nesse estágio.	
Estágio 3 Madura		Apresenta a maior espessura de todos os estágios, preenchendo toda a cavidade abdominal e cefalotorácica. Apresenta forte coloração, tornando-se facilmente visível.		Predominância de ovócitos maduros com grânulos de vitelo por todo o citoplasma celular que aumenta de tamanho.	

Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 Análises histológicas do hepatopâncreas e intestino

As figuras abaixo (16 e 17), oriundas das análises de fêmeas de camarões *P. vannamei* do próprio experimento, foram utilizadas como referência para indicação e visualização das estruturas de interesse nos tecidos analisados.

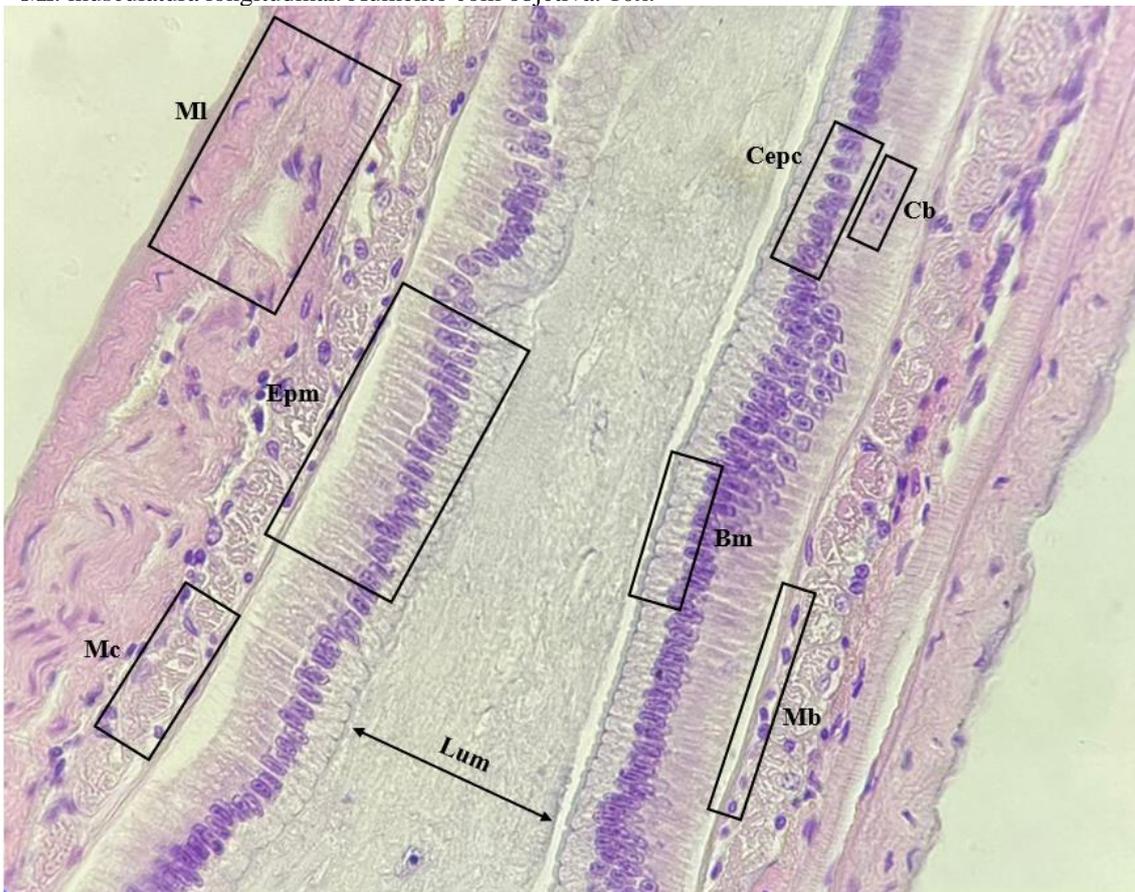
Figura 16 – Fotomicrografia de corte histológico do hepatopâncreas mostrando os principais tipos celulares de uma estrutura normal da zona medial do túbulo hepatopancreático. (A) objetiva de 10x; (B) objetiva de 40x. Círculos verdes indicam o túbulo; amarelos, os tipos celulares, e a seta em azul indica o lúmen. As siglas significam: **Lu** – lúmen. **B** – célula B; **E** – célula E; **F** – célula F; **R** – célula R. Aumento com objetiva: 10x.



Fonte:

Elaborada pela autora.

Figura 17 – Fotomicrografia de cortes histológicos de intestino médio mostrando as principais estruturas. As siglas significam: **Bm**: bordas das microvilosidades; **Cb**: células basais; **Cepc**: células epiteliais colunares simples; **Epm**: epitélio mucoso; **Lum**: lúmen; **Mb**: membrana basal; **Mc**: musculatura circular; **Ml**: musculatura longitudinal. Aumento com objetiva: 10x.

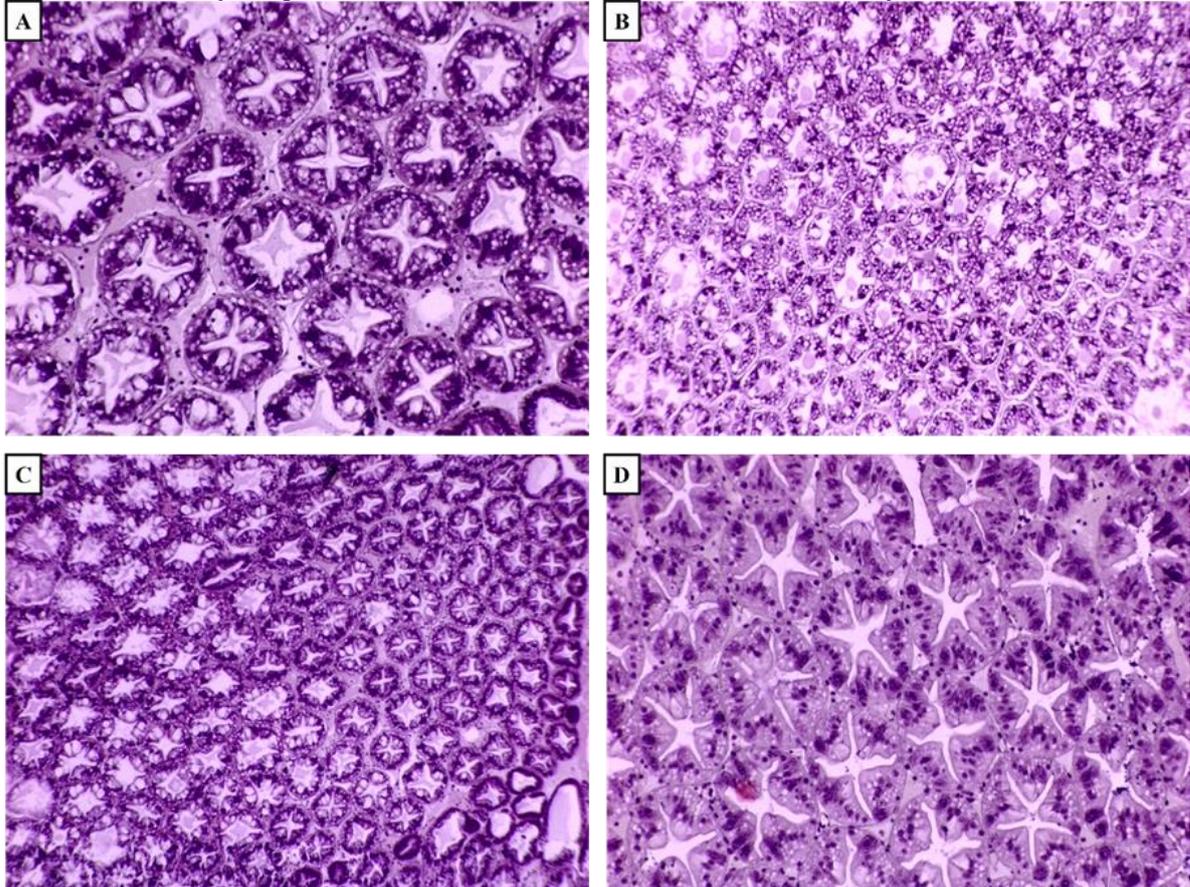


Fonte: Elaborada pela autora.

Nas análises das lâminas de hepatopâncreas do presente estudo, foi possível identificar todos os tipos celulares citados, destacados na Figura 16. Não foram observadas diferenças significativas nos tipos celulares, ou maior quantidade de um em detrimento de outro entre os tratamentos. Além disso, tanto no controle quanto no óleo, foram observadas estruturas

normais, sem alterações nos túbulos hepatopancreáticos, em consonância com Bell e Lightner (1988) (Figura 18).

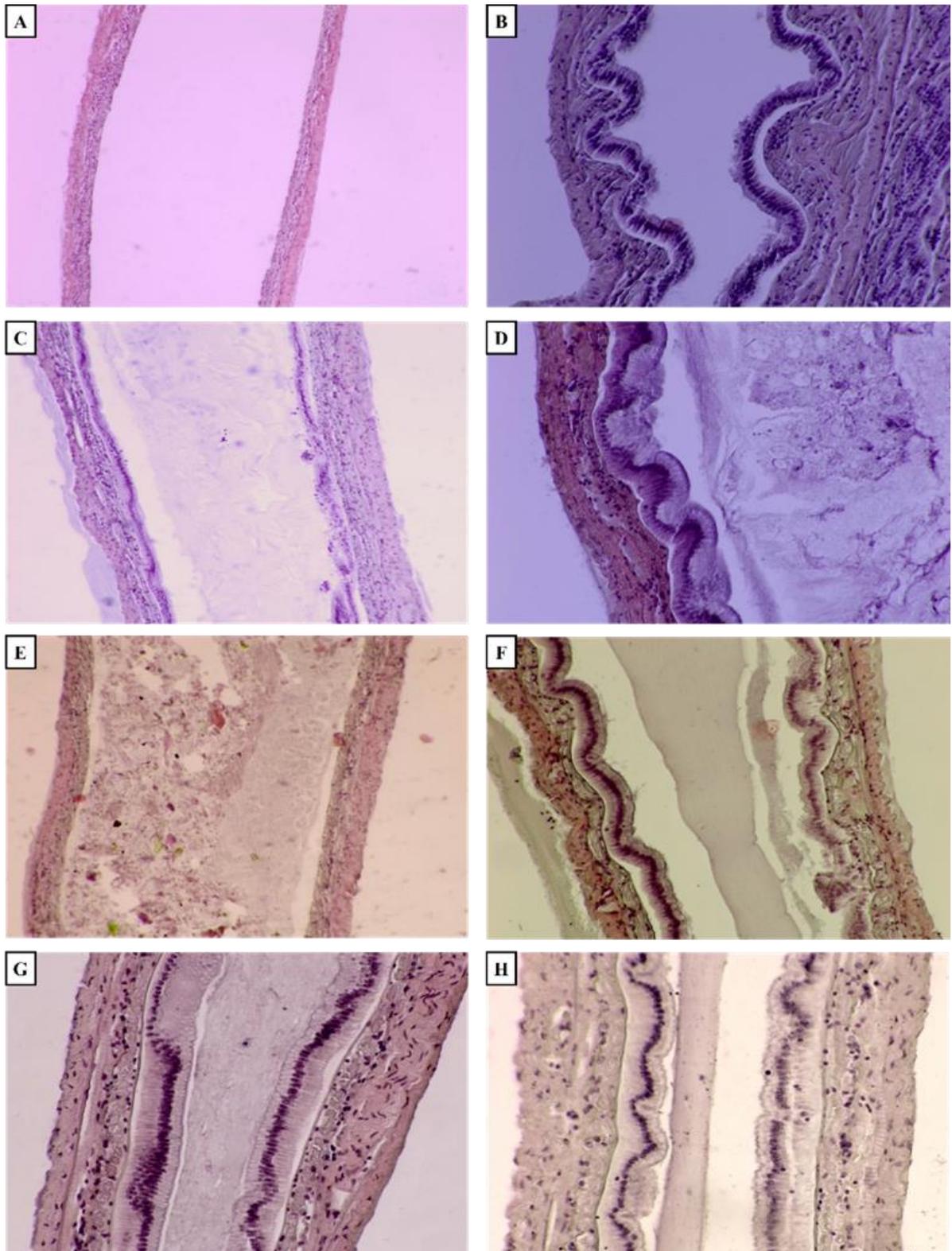
Figura 18 – Fotomicrografias de cortes histológicos de hepatopâncreas das fêmeas do controle (A e B) e fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco (C e D). Aumento com objetiva: 10x.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nos intestinos das fêmeas analisadas, foi possível notar a presença de vilosidades em ambos os tratamentos, em todas as coletas, sem diferenças significativas entre tratamentos. Nos mesmos foi também possível observar a presença de alimentos e a integridade do tecido. Não foram notadas alterações histológicas no intestino de nenhuma das fêmeas analisadas ao longo do experimento para nenhum dos tratamentos (Figura 19).

Figura 19 – Fotomicrografias de cortes histológicos de intestinos das fêmeas do controle (A e C: ausência de vilosidades; B e D: presença de vilosidades). Fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco (E e G: ausência de vilosidades; F e H: presença de vilosidades). Aumento com objetiva: 10x.



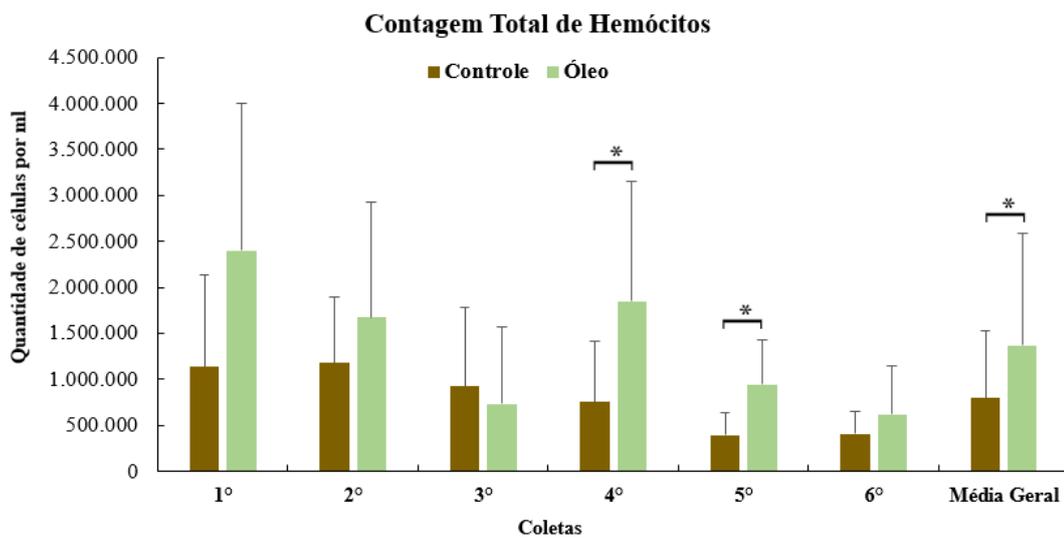
Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 Contagem total de hemócitos

Conforme exposto no Gráfico 11, no presente estudo, os valores médios das contagens variaram entre 390.417 e 2.403.542 cel/mL. Todas as fêmeas coletadas apresentavam aspecto de animais saudáveis. No presente estudo, notou-se que as fêmeas das coletas iniciais, para ambos os grupos avaliados, apresentaram valores mais elevados (Gráfico 11).

Diferenças significativas foram detectadas nas coletas quatro e cinco (primeiro e segundo mês em produção, respectivamente) e na média geral, com valores mais elevados nas contagens das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco.

Gráfico 11 – Médias das contagens de hemócitos das fêmeas por tratamento e coleta.

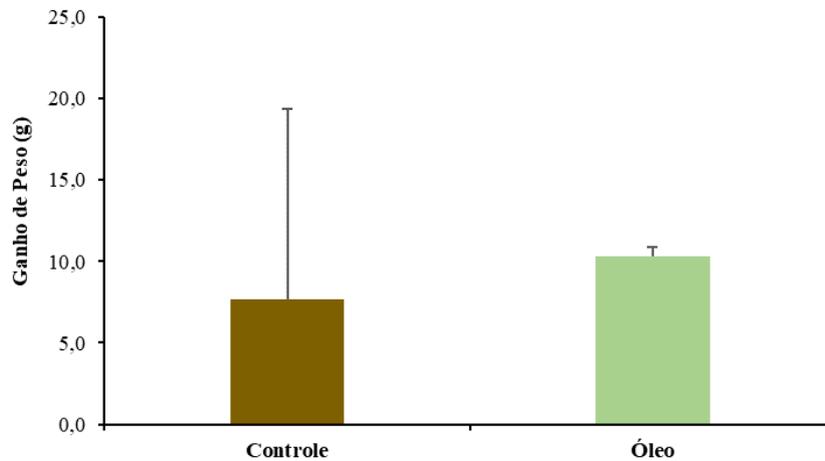


Fonte: Elaborado pela autora.

5.5 Ganho de peso

Conforme exposto no Gráfico 12, as fêmeas do grupo alimentado com ração contendo óleo de coco diferiram significativamente das do controle, apresentando $10,3 \pm 0,6$ e $7,7 \pm 11,7$ gramas de ganho de peso final, respectivamente.

Gráfico 12 – Média do ganho de peso das fêmeas do controle e do grupo alimentado com ração suplementada com óleo de coco, ao final do experimento.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 Expressão gênica

5.6.1 Expressão de genes relacionados à imunidade

O gene *SOD* nos ovários apresentou *down-regulations* na primeira coleta (antes da ablação) (2,5x) e terceira coleta (uma semana em produção) (4,9x). *Up-regulation* foi observada na quarta coleta (primeiro mês em produção) (2,0x). No hepatopâncreas, nas coletas um (antes da ablação) (1,8x) e quatro (primeiro mês em produção) (5,6x) ocorreram *down-regulations*, e nas coletas cinco e seis (segundo e terceiro mês em produção) expressou 17,5 e 5,6 vezes mais, respectivamente, em relação ao controle (Figura 20 A e B).

As expressões relativas desse gene foram superiores nos ovários quando comparadas ao hepatopâncreas. As maiores foram registradas nas quatro primeiras coletas, principalmente para o controle, com exceção da quarta coleta, que foi maior a expressão para o grupo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo, tendo sido também o pico de expressão nesse tecido. No hepatopâncreas, o pico de expressão ocorreu na quinta coleta (dois meses em produção) para o grupo alimentado com ração suplementada com óleo de coco (Figura 20 A e B).

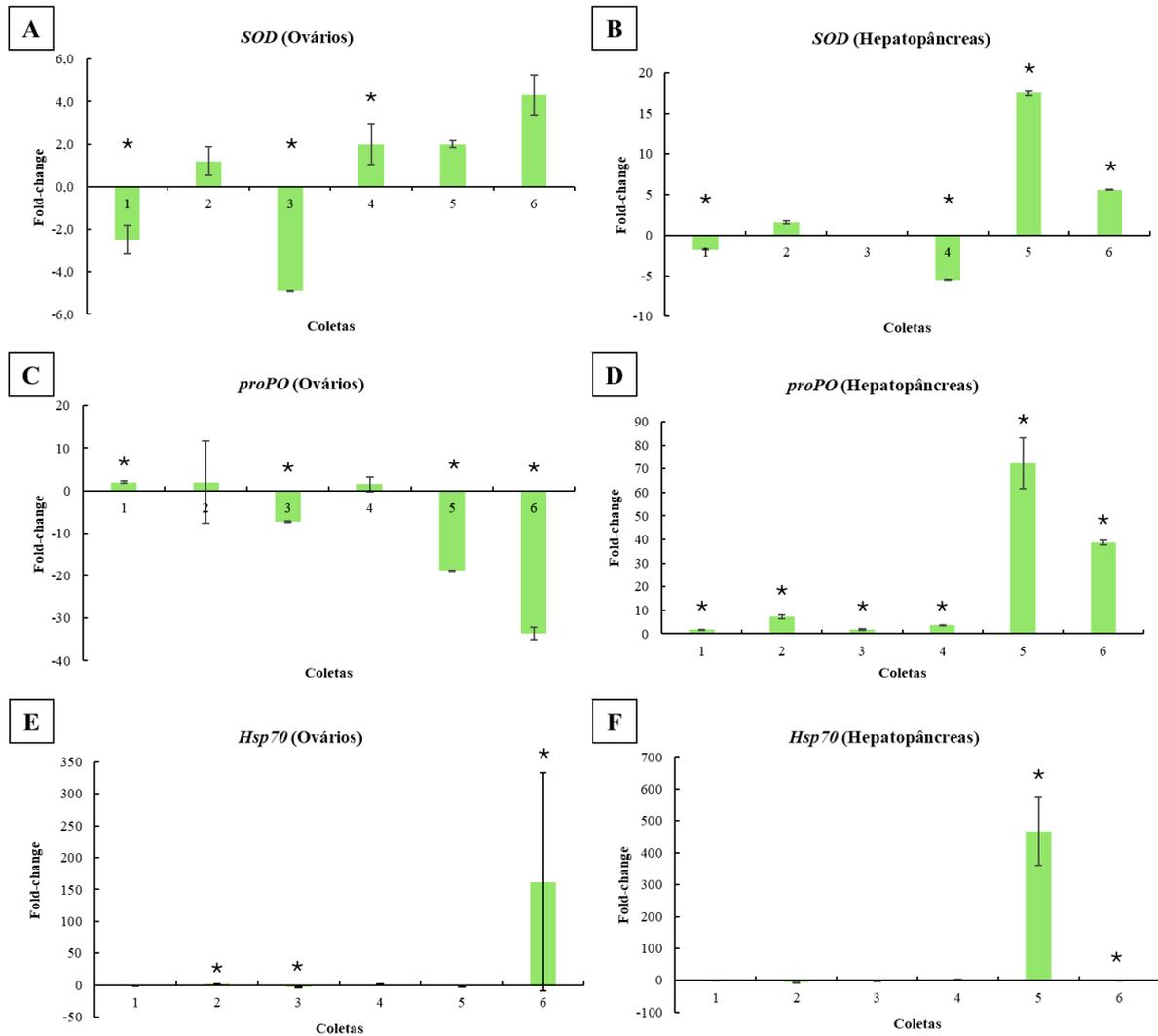
O gene *proPO*, reconhecido por sua atuação imunológica, também apresentou *up-regulations* mais visíveis nos ovários que no hepatopâncreas. No primeiro tecido, diferenças significativas foram detectadas nas coletas um, três, cinco e seis (antes da ablação, uma semana em produção, segundo e terceiro mês em produção, respectivamente). Com exceção da primeira coleta, em que houve *up-regulation* (2x), nas demais ocorreu *down-regulations*, expressando

7,3, 18,8 e 33 vezes menos em relação ao controle, nas coletas três, cinco e seis, respectivamente, apresentando o valor mais elevado no controle no terceiro mês em produção (Figura 20 C).

No hepatopâncreas, em todas coletas, as fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco apresentaram *up-regulation* para o *proPO*. Apresentando, na segunda, terceira, quarta, quinta e sexta coletas, respectivamente, índices de expressão 1,8x, 7,2x, 1,7x, 3,8x, 72,4x e 38,7x maiores em relação ao controle. Assim como o *SOD* no hepatopâncreas, o pico de expressão e *up-regulation* de *proPO* nesse mesmo tecido também foi na quinta coleta (dois meses em produção), no grupo de camarões alimentados com ração suplementada com óleo de coco (Figura 20 D).

Em nosso trabalho, *Hsp70* foi superexpresso nos ovários na sexta coleta, referente ao terceiro mês em produção (161,7x), tendo sido também *up-regulation* na segunda coleta, realizada quatro dias após ablação (1,8x). Na terceira coleta, referente à primeira semana em produção, houve *down-regulation* (2,6x). No hepatopâncreas, também foi registrada uma superexpressão de *Hsp70* na quinta coleta (467,4x), segundo mês em produção. Na coleta seis (terceiro mês em produção) também apresentou maior expressão que no controle (1,9x) (Figura 20 E e F).

Figura 20 – Painel de genes relacionados à imunidade e estresse nos ovários e hepatopâncreas de fêmeas de *Penaeus vannamei* alimentadas com ração suplementada com óleo de coco.



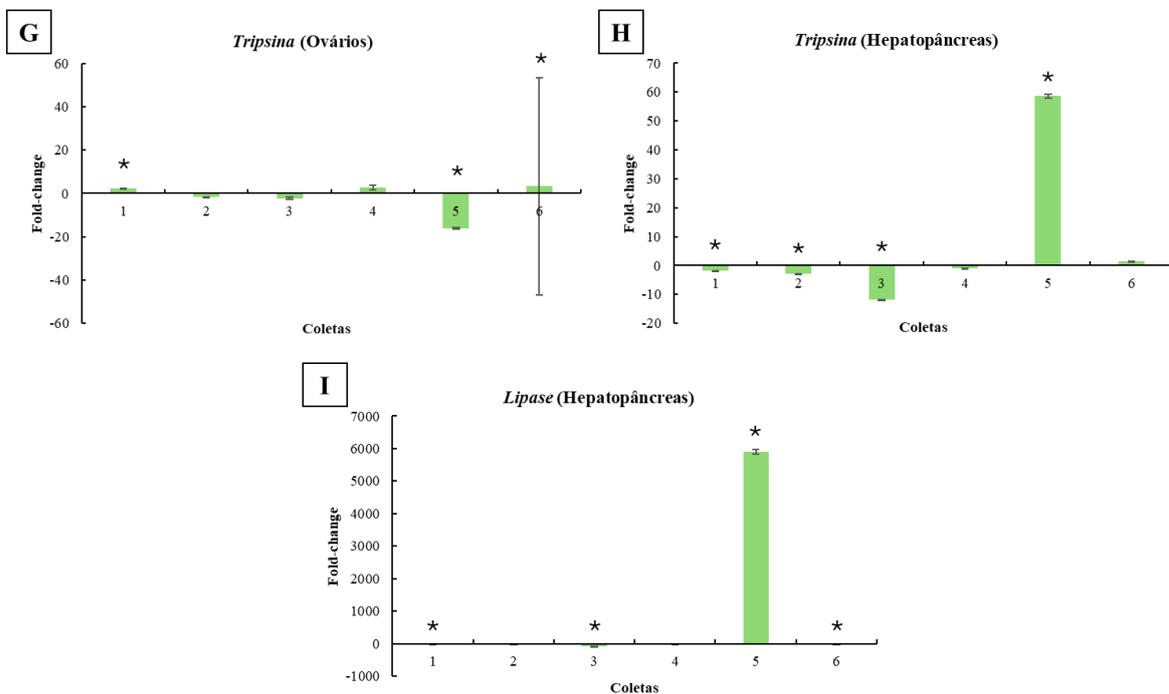
Fonte: Elaborada pela autora.

5.6.2 Expressão de genes relacionados à nutrição

Nos ovários das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco, *up-regulation* foram registradas nas coletas um e seis, (antes da ablação e três meses em produção, respectivamente), sendo 2,2 e 3,3 vezes mais expressos que o controle, respectivamente. Na quinta coleta, referente ao segundo mês em produção, ocorreu *down-regulation*, expressando 16,2 vezes menos quando comparados ao controle. Já no hepatopâncreas, a expressão relativa foi *down-regulation* nas coletas um (1,8x), dois (2,9x) e três (11,8x) (antes da ablação, quatro dias após ablação e com uma semana em produção, respectivamente). Apresentou seu pico de expressão e *up-regulation* na quinta coleta (58,6x), com dois meses em produção (Figura 21 G e H).

Para o gene *Lipase* não ocorreu amplificação no tecido ovariano das fêmeas avaliadas. No hepatopâncreas, nas primeira e terceira coletas (antes da ablação e com uma semana em produção, respectivamente), ocorreu *down-regulation* da expressão de *Lipase* no grupo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco (2,1 e 71,8 vezes menos, respectivamente). Enquanto nas últimas duas coletas, quinta e sexta, referentes aos segundo e terceiro mês em produção, foram *up-regulations*, expressando 5.895,6x e 2,3x mais, respectivamente (Figura 21 I).

Figura 21– Painel de genes relacionados à nutrição nos ovários e hepatopâncreas de fêmeas de *Penaeus vannamei* alimentadas com ração suplementada com óleo de coco.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.6.3 Expressão de genes relacionados à maturação/reprodução

Em nossas análises utilizando tecido ovariano e hepatopâncreas, não ocorreu amplificação do gene *mprg* nas amostras de ovários do controle. Entretanto, para o grupo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo, houve expressão nas primeira (antes da ablação), segunda (quatro dias após ablação) e sexta (terceiro mês em produção) coletas, sendo nesta última o pico de expressão (Figura 22 J).

No hepatopâncreas, diferente dos ovários, ocorreu amplificação do *mprg* em todas as coletas em ambos os tratamentos, com *down-regulation* nas coletas um (antes da ablação)

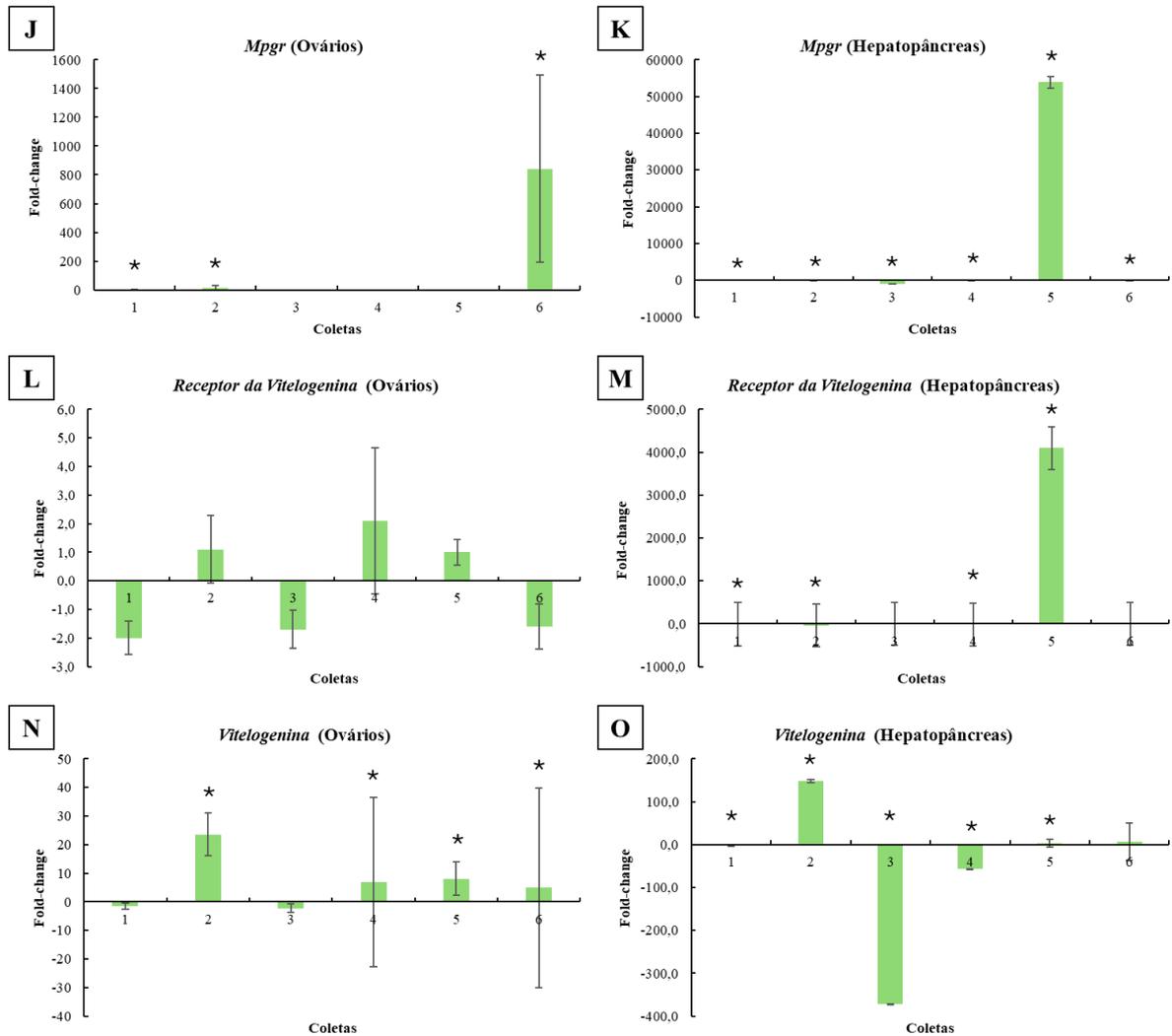
(2,5x), dois (quatro dias após ablação) (1,5x) e três (uma semana em produção) (976,7x). Nas últimas coletas houve *up-regulation*, expressando 5,4x, 58.852,0x e 2,9x mais nas coletas quatro (um mês em produção), cinco (dois meses em produção) e seis (três meses em produção), respectivamente (Figura 22 K).

Nossos resultados mostram que nos ovários não houve diferenças nas expressões relativas do *vtgr* entre os tratamentos em nenhum dos pontos amostrados. Já para o hepatopâncreas, apenas a quinta coleta, que é referente ao segundo mês em produção, ocorreu *up-regulation*, com uma expressão 4.093,1 vezes maior no grupo alimentado com ração suplementada com óleo de coco em relação ao controle. Nas demais, os transcritos de *vtgr* foram *down-regulation*, expressando 10,0, 38,1 e 13,5 vezes menos nas primeira, segunda e quarta coleta, respectivamente (Figura 22 L e M).

No presente trabalho, nos ovários, o gene *vtg* apresentou *up-regulation*, com expressão dos transcritos mais evidente no grupo alimentado com ração suplementada com óleo, nas coletas dois (23,6x), quatro (6,8x), cinco (8,0x) e seis (4,9x) (quatro dias após ablação, um mês, dois meses e três meses em produção, respectivamente) (Figura 22 N).

No hepatopâncreas, na coleta inicial, ocorreu *down-regulation* de *vtg* (2,5x), assim como a terceira e quarta coleta (uma semana e um mês em produção, respectivamente), em que a expressão foi 372,3x e 56,5x menor. Já nas coletas dois, cinco e seis (quatro dias após ablação, dois e três meses em produção, respectivamente) houve *up-regulation*, expressando 147,9x, 3,3x e 7,0x mais, respectivamente (Figura 22 O). Em ambos os tecidos, os níveis de transcritos de mRNA de *vtg* foram mais evidentes na sexta coleta (terceiro mês em produção).

Figura 22 – Painel de genes relacionados à maturação e reprodução nos ovários e hepatopâncreas de fêmeas de *Penaes vannamei* alimentadas com ração suplementada com óleo de coco.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.7 Desempenho geral

Os dados de desempenho das fêmeas, apresentados e discutidos de forma detalhada nos tópicos anteriores, foram organizados na Tabela 6 para visualização resumida e simplificada. Nela é possível observar que em relação às médias gerais do final do experimento, com exceção das variáveis número de abortos, número de ovos, índices hepatossomático e gonadossomático, todas as outras apresentaram diferença significativa.

Tabela 6 – Desempenho geral das fêmeas do controle e do grupo alimentado com ração contendo óleo de coco.

Variável	Tratamentos	
	Controle	Óleo
Ganho de peso (g)	7,7 ± 11,7 ^a	10,3 ± 0,6 ^b
Taxa de cópulas diárias (%)	16,3 ± 3,7 ^a	19,6 ± 5,4 ^b
Número de abortos diários	1 ± 2	1 ± 1
Taxa de desovas diárias (%)	15,7 ± 3,6 ^a	19,1 ± 5,8 ^b
Número diário de ovos por fêmea	269.087 ± 77.499	261.542 ± 62.972
Taxa de eclosão diárias (%)	70,0 ± 6,8 ^a	74,6 ± 8,2 ^b
Número diário de náuplios por fêmea	223.051 ± 47.743 ^a	247.456 ± 48.821 ^b
Índice Gonadossomático (%)	1,7 ± 1,6	2,1 ± 1,6
Índice Hepatossomático (%)	3,0 ± 0,6	3,1 ± 0,7
Contagem Total de Hemócitos (cel/mL)	797.569 ± 725.860 ^a	1.370.416 ± 1.223.261 ^b

Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

6.1 Desempenho reprodutivo

6.1.1 Taxa de cópulas

Analisando o gráfico das médias mensais (Gráfico 1), nota-se que no primeiro mês em produção, os tratamentos não diferem entre si, sugerindo que para esse parâmetro, os efeitos do óleo só são perceptíveis a partir do segundo mês. Foi possível observar também constância na taxa de cópulas das fêmeas do controle ao longo dos três meses em produção. Já nos animais alimentados com dieta contendo óleo de coco há uma tendência crescente na taxa de cópulas, atingindo seu pico no terceiro mês, com valor médio geral ao final do experimento de 22%, enquanto o controle apresenta 16%. Esses resultados demonstram que a adição do óleo à dieta pode influenciar positivamente no número de cópulas.

Dentre os poucos estudos que testaram substituição e/ou suplementação de fontes lipídicas na reprodução de peneídeos, nenhum deles analisou especificamente o número de cópulas (LIM *et al.*, 1997; Sousa, 2017; Sun *et al.*, 2020; Liang *et al.*, 2022). No estudo de Menezes (2019), comparando o desempenho reprodutivo de fêmeas abladas e não abladas, as taxas de cópulas diárias foram 11,7% e 6,5%, respectivamente.

Yano e colaboradores (1988), em estudo que visou analisar o comportamento reprodutivo de *P. vannamei* cultivados, registraram taxa de cópula de 12,5%. No dia a dia do setor de maturação de *P. vannamei* cultivados no Brasil, essa taxa é considerada razoável. Taxas inferiores a 10% já não são tão satisfatórias, e se recorrente, podem indicar algum problema no plantel, ou mesmo que estes já necessitam de substituição. Os resultados do presente estudo em ambos os tratamentos ultrapassam as taxas observadas pelos autores citados, com os animais do grupo óleo superando os do tratamento controle, levando a inferir que o uso do óleo de coco provoca aumento na taxa de cópula.

É visível e significativo o aumento do número de cópulas no grupo dos camarões alimentados com ração suplementada com óleo de coco. No entanto, no presente estudo, que não se propôs a estudar com mais profundidade a composição e propriedades do presente óleo, e também pela escassez de informações na literatura e estudos prévios nessa linha, não foi possível explicar exatamente o que no óleo de coco causa esse efeito nos animais com ele alimentados.

6.1.2 Número de abortos

Os resultados dos parâmetros taxa de cópulas e taxa de desovas se assemelham, pois o esperado é que as fêmeas copuladas levadas aos tanques de desovas realizem esse processo. No entanto, pode ocorrer que nem todas as fêmeas consigam desovar, por fatores diversos, tais como estresse e outros aspectos fisiológicos, estágio maturacional visível diferindo do estágio celular, levando aos tanques de desovas fêmeas que ainda não estavam preparadas para desovar. Pode acontecer também o aborto, onde há a morte dos embriões, e ocorre a liberação pela fêmea de uma massa gonadal com um aglomerado de ovócitos que tiveram seu processo de formação e fecundação interrompidos e foram liberados precocemente (Figura 23).

Figura 23 – Fundo do tanque de desova mostrando aborto (círculo vermelho).



Fonte: Elaborada pela autora.

No momento da captura individual das fêmeas nos tanques de desova para devolução aos seus tanques de origem, as mesmas eram examinadas para verificar se haviam desovado. No presente trabalho, foi registrado um número médio baixo de abortos e desovas interrompidas em ambos os tratamentos (Gráfico 2), e isso é um resultado satisfatório, uma vez que demonstra um manejo adequado, bom estado fisiológico dos animais e bom desempenho reprodutivo.

Pode-se inferir que o tempo em produção e a idade reprodutiva das fêmeas tenha relação com esse fenômeno, pois foi demonstrado que fêmeas a partir do segundo mês em produção apresentam maior estabilidade produtiva e menos dificuldades em suas desovas, atingindo no terceiro mês o estágio mais desejado de produtividade, referente a esse parâmetro analisado.

Apesar da diferença entre os tratamentos no segundo mês em produção, com melhores resultados para o grupo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco, não se pode concluir que a adição do mesmo diminua o número de abortos, uma vez que as médias foram muito similares para ambos os tratamentos, e a média geral não diferiu.

Poucos são os relatos na literatura que tratam sobre abortos em camarões. Nos poucos trabalhos encontrados, a informação normalmente aparece na metodologia, sem elucidar com maiores detalhes as causas que o provocam, e sem discuti-las. Apenas estudos com camarões de água doce apresentaram esses dados.

A espécie *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) quando submetida ao cultivo em salinidade de 20 psu apresentou aborto em todas as fêmeas, demonstrando que para essa espécie, que é de água doce, a salinidade elevada interfere no desenvolvimento embrionário, sendo inclusive causa de abortos, chegando até a provocar a morte das fêmeas (FUKUDA; BERTINI; ALMEIDA, 2016). Em outro estudo com a mesma espécie, Rodrigues *et al.* (2022) ao testarem os efeitos da ablação em *M. acanthurus*, notaram que a mesma não afetou a oogênese com base na estrutura ovariana, tamanho do oócito, propriedades histoquímicas e oócitos atrésicos, e também não acelerou a maturação ovariana. Notaram ainda que fêmeas que iniciaram o experimento com ovários maduros geraram oócitos não fertilizados e abortaram.

Em camarões Neocaridina, o efeito do diclofenaco em concentração elevada causou redução na porcentagem de ovos por fêmea e também causou a mortalidades dos embriões, provocando abortos (ZANITTI *et al.*, 2022).

Para camarões peneídeos, não foram encontrados relatos sobre abortos e suas possíveis causas. No entanto, acredita-se que manejo inapropriados, estresses fisiológicos sofridos pelas fêmeas, condições de cultivo inadequadas, incluindo salinidade, temperatura e desequilíbrio iônico, e até mesmo a idade das fêmeas são fatores que podem ocasionar mortalidades dos embriões e conseqüentemente abortos. São necessários estudos que se dediquem a investigar com maior profundidade esse fenômeno em camarões peneídeos, uma vez que este grupo concentra algumas das principais espécies produzidas pela carcinicultura mundial, a exemplo de *P. vannamei* e *P. monodon*.

6.1.3 Taxa de desovas

Uma das características mais importante das espécies aquícolas é a sua capacidade reprodutiva e de produção de descendentes viáveis em suas desovas. Vários fatores têm um

impacto significativo na quantidade e frequência de desovas, qualidade e quantidade de ovos. Dentre eles estão: idade, tamanho do reprodutor, tipo de manipulação, variância genética e alimentação fornecida (RACOTTA; PALACIOS; IBARRA, 2003).

Entre os alimentos frescos naturais que são amplamente utilizados para alimentar camarões peneídeos reprodutores, a lula e poliqueta estão entre os que mais estimulam a maturação gonadal e desova (MEUNPOL; MEEJING; PIYATIRATITIVORAKUL, 2005). Poliquetas podem fornecer um equilíbrio nutricional correto de ácidos graxos poliinsaturados, que são essenciais para a maturação dos ovócitos em camarões cultivados. Em estudo realizado por Galal, Said e Sharaf (2022), os mesmos constataram que dietas contendo poliquetas aumentam a eficiência do desempenho reprodutivo do camarão *P. vannamei*, conferindo inclusive, maiores taxas de desovas.

Emerenciano *et al.* (2012) testando o uso de alimentos frescos no sistema de bioflocos, relataram que com apenas 20 dias recebendo essa alimentação, já foi possível notar que as fêmeas tratadas desovaram mais rapidamente quando comparadas às do controle. O grupo teste alcançou ainda um maior número de desovas, maior número de ovos por desova e menos desovas não fertilizadas.

Fêmeas reprodutoras da espécie *P. vannamei* apresentam capacidade restrita de biossíntese de fosfolipídeos. Cahu *et al.* (1994) relataram que deficiências dietéticas de fosfolipídeos e LC-PUFA levam a uma diminuição da frequência de desova e do número de ovos por desova em camarões cultivados. Desse modo, alimentos que forneçam esses compostos essenciais devem ser incluídos na dieta de camarões reprodutores. Maneii *et al.* (2019) observaram menor período de latência (tempo até a primeira desova) em fêmeas reprodutoras alimentadas com a dieta contendo 40 g de lecitina de soja por kg, que coincidiu com maiores concentrações de colesterol na hemolinfa, indicando que houve aumento da mobilização de lipídios do hepatopâncreas para os ovários neste grupo.

No presente estudo, as maiores taxas de cópulas e desovas constatadas nas fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco demonstram que a adição deste composto influencia positivamente nesse parâmetros reprodutivo, sugerindo que o mesmo quando oferecido da forma e quantidade utilizada no presente estudo pode aumentar a frequência de cópulas e desovas.

6.1.3.1 Quantidade de desovas por fêmea

Durante o experimento, bem como na produção de modo geral, ocorrem mortalidades por diversos fatores, tais como estresse fisiológico advindo de muda, manejo, ablação, o próprio ato reprodutivo em si, sanidade entre outros. Desse modo é de se esperar que em um tanque de produção ao longo do cultivo, fêmeas desovem e não sobrevivam até o final do ciclo produtivo daquele lote, e isso foi claramente observado em nosso estudo. Assim, como foi citado na seção de resultados, para esse parâmetro analisado e para apresentação desses dados, apenas as fêmeas que sobreviveram até o final do experimento entraram nesses resultados.

De acordo com os dados apresentados nos Gráficos 4 e 5, nossos resultados mostram que o número de desovas por fêmea é muito variável, ainda que todas estejam no mesmo ambiente de cultivo, recebam o mesmo tratamento, alimento e condições, e apresentem aspectos visuais de animal saudável.

Foi possível observar ainda que algumas fêmeas de um plantel podem, durante três meses, não realizarem nenhuma desova. De acordo com Cavalli, Scardua e Wasielesky, (1997), a maior parte da produção de náuplios em um incubatório pode ser atribuída apenas a uma proporção limitada de fêmeas. E essas que contribuem para a maior parte da produção compartilham pelo menos uma característica comum: a capacidade de desovas frequentes e múltiplas. Os camarões podem amadurecer novamente e ter desovas sucessivas em um tempo relativamente curto, como consequência da ablação do pedúnculo ocular (PALACIOS; IBARRA; RACOTTA, 2000).

No trabalho de Carvalho, Andreatta e Fracalossi (2010), foi relatada média mensal de aproximadamente uma cópula com desova por fêmea, sem diferenças para os diferentes tratamentos aplicados (alimentação com dieta controle; dieta contendo gônada de peixes; dieta contendo artêmia). Nesta pesquisa, foram obtidas média mensal de três e quatro desovas por fêmea para o controle e no grupo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo, respectivamente, superando as médias deste outro estudo, e demonstrando que o grupo alimentado com ração contendo óleo de coco apresenta desempenho superior nesse quesito.

A respeito da diferença entre a qualidade de desovas e suas proles em fêmeas que desovam mais ou menos vezes, ou que desovam logo após ablação ou mais tardiamente, nosso estudo não se propôs a gerar essas respostas, uma vez que só foi possível trabalhar com tanques de desovas coletivas. No entanto, esta é uma informação importantíssima, uma vez que tão importante quanto o número de desovas e quantidade de ovos e náuplios gerados, é conhecer a qualidade dos mesmos.

Em acompanhamento individual de fêmeas de *P. vannamei* marcadas na mesma condição de maturação foi evidenciado que não há declínio substancial na qualidade da desova como efeito do número de desovas, avaliadas a partir das taxas de fertilização e eclosão e nem no processo de maturação dos oócitos em relação ao número de desovas (PALACIOS; RACOTTA, 1999; PALACIOS; RODRÍGUEZ-JARAMILLO; RACOTTA, 1999). No entanto, foi constatado que a qualidade das proles diminui ao longo do tempo. Contudo, esta diminuição não foi necessariamente uma consequência direta do número de desovas, mas é possível que seja resultado de outras condições de maturação que podem ser alteradas durante o ciclo de produção (dieta, doença, stress, ablação etc.) (PALACIOS; IBARRA; RACOTTA, 2000).

Quanto ao uso do óleo de coco para o aumento da frequência de desovas, nosso estudo mostra que o mesmo pode influenciar positivamente, uma vez que resultados superiores foram observados nas fêmeas alimentadas com ração suplementada quando comparadas ao controle. Apesar disso, pelo fato de esse ser o primeiro estudo utilizando óleo de coco na dieta de *P. vannamei*, os resultados obtidos requerem mais repetições e investigações mais aprofundadas, para entender de que modo o presente óleo atua nessa melhora.

6.1.4 Número de ovos

Em seu ambiente natural, fêmeas de camarões peneídeos podem expelir por desova entre 60.000 e 700.000 ovos, a depender da espécie e tamanho do animal. Esses ovos são fecundados externamente pelos espermatozoides no momento da desova (BARBIERI-JUNIOR; OSTRENSKY, 2001). Em condições de cultivo, as fêmeas de *P. vannamei* podem produzir até 300 mil ovos por desova e maturar cerca de quatro vezes ao mês (SENAR, 2016). Em nosso estudo, foram obtidos valores aproximados desta referência, com média 269.079 ovos por fêmea no controle, e 261.542 no grupo de fêmeas alimentadas com ração contendo óleo de coco.

Ao avaliar o número de ovos em grupos de fêmeas abladadas e não abladadas, Menezes (2019) obteve valores inferiores quando comparados aos do presente estudo, para fêmeas abladadas (179.120 ± 32.466 ovos por fêmea). Carvalho, Andreatta e Fracalossi (2010) ao testarem o efeitos de diferentes suplementações em dietas de reprodutores de *P. vannamei*, notaram que fêmeas alimentadas com dietas contendo gônadas de peixes e artêmia alcançaram maior produção de ovos, quando comparadas ao controle, atingindo valores aproximados de 225.000 e 214.000 ovos por fêmeas nos tratamentos com gônadas e artêmia, respectivamente. Esses valores aproximam-se com os do presente estudo.

Nesta pesquisa, o uso do óleo de coco na alimentação das fêmeas não interferiu na quantidade de ovos, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

6.1.5 Taxa de eclosão

Não foram analisados aspectos mais aprofundados sobre a qualidade dos ovos, todavia, diversos autores afirmam que a qualidade dos mesmos, bem como sua taxa de eclosão estão intimamente relacionados com fatores como ambiente de cultivo, nutrição e estado fisiológico da fêmea (ARCOS *et al.*, 2003; CORRAL-ROSALES *et al.*, 2018; NASER; SARKER; HOSAIN, 2022).

No presente estudo, as taxas de eclosão diárias ao longo do experimento variaram entre 55,4 e 97,0%. Esses dados estão de acordo com os de Andriantahina *et al.* (2012), que em seu trabalho comparando o ambiente de cultivo de reprodutores obteve taxa de eclosão entre 83% e 85%, e com os de Menezes (2019) que testou os efeitos da ablação no desempenho reprodutivo de fêmeas, que atingiram 69,0 e 70,8% de taxa de eclosão para fêmeas ablatadas e não ablatadas, respectivamente.

A dieta ofertadas aos camarões reprodutores influencia diretamente na qualidade de suas proles (PALACIOS *et al.*, 2002). Xu *et al.* (1994) testaram o efeito de dietas contendo diferentes fontes lipídicas (óleos de anchova, linhaça, milho e banha de porco) na fecundidade, eclodibilidade dos ovos e composição de ácidos graxos do tecido gonadal de reprodutores de camarão *Penaeus chinensis* (Osbeck, 1765), comparando com uma dieta de moluscos frescos. Reprodutores alimentados com dieta contendo banha de porco apresentaram baixa fecundidade e baixa eclodibilidade dos ovos. Os alimentados com dietas contendo óleo de linhaça ou milho apresentaram melhor produção de ovos; no entanto, nenhuma melhoria significativa na eclodibilidade foi observada. Quando os reprodutores foram alimentados com dieta contendo óleo de anchova, tanto a fecundidade quanto a eclodibilidade dos ovos melhoraram significativamente. Estes apresentaram maior teor de ácidos graxos n-3 altamente insaturados (HUFA) (27,6%) em comparação com aqueles de camarões alimentados com dietas contendo óleo de linhaça (19,5%), óleo de milho (14,0%) ou banha de porco (12,8%). Foram observadas boas correlações entre o conteúdo 20:5 n-3 do lipídio do ovo e a fecundidade e entre o conteúdo 22:6 n-3 e a eclodibilidade. Os resultados sugerem que cada um destes n-3 HUFAs pode desempenhar papéis diferentes e específicos na reprodução dos crustáceos e que um ou ambos devem ser incluídos na dieta dos reprodutores.

Conforme citado na seção de revisão de literatura, assim como os óleos de origem vegetal utilizados no estudo supracitado, o óleo de coco utilizado no presente estudo também não apresenta em sua composição esses ácidos graxos essenciais na dieta de camarões, como EPA e DHA. Apresenta em pouca quantidade o ácido linoleico, que é um dos essenciais ao camarão. No entanto, não se sabe ao certo, e não foi objetivo deste estudo investigar o quanto a presença deste ácido específico pode influenciar em parâmetros como eclodibilidade e qualidade de ovos e náuplios. Esta é uma lacuna que pode ser preenchida com estudos futuros adicionais. Todavia, ficou evidente que o uso do óleo de coco adicionado à ração confere maiores taxas de eclosão nas fêmeas que receberam essa dieta.

6.1.6 Número de náuplios

A quantidade de náuplios produzidos por fêmea de *P. vannamei* em uma desova é muito variável, uma vez que a quantidade de ovos também sofre grande variação, a depender de diversos fatores como condições de cultivo, idade e tamanho da fêmea, qualidade espermática do macho, sanidade dos reprodutores, tempo em produção, alimentação fornecida, manejo, entre outros. A quantidade de náuplios depende diretamente da quantidade de ovos e da qualidade dos mesmos, que resultarão em maior ou menor taxa de eclosão.

Em estudo com *L. vannamei* abladadas e não abladadas, pesquisadores relataram que a produção média de náuplios por fêmeas foi de 95.127 para o primeiro grupo, e 112.610 para o segundo (ZACARIAS *et al.*, 2019). Carvalho, Andreatta e Fracalossi (2010) demonstraram que fêmeas alimentadas com dietas contendo gônadas de peixe marinho, *Artemia* sp. e dieta controle produziram por desova 95.200, 90.900 e 67.400 náuplios por fêmea, respectivamente. Na pesquisa de Corral-Rosales *et al.* (2018), utilizando *Ulva clathrata* (Roth) na dieta de reprodutores de *P. vannamei*, registraram 128.000 náuplios por fêmea no controle e 151.000 no tratamento com *U. clathrata*.

Conforme mencionado, as quantidades de náuplios por fêmea em uma desova variam muito, inclusive dentro da mesma espécie. Nos experimentos conduzidos utilizando óleo de coco na dieta de fêmeas de *P. vannamei*, tal quantidade variou entre 95.294 e 360.000 náuplios por fêmea.

Embora a média geral da quantidade de ovos no controle tenha sido maior que no óleo, o número de náuplios no tratamento com óleo superou o controle, devido à sua maior taxa de eclosão (Gráfico 7). Este é um resultado positivo, uma vez que o primeiro estágio larval

propriamente dito é o náuplio, e é a partir daí que o animal se desenvolverá. O número de náuplios é um importante parâmetro de produtividade.

Nossas médias gerais do número de náuplios por fêmea são elevadas, aproximando-se ou mesmo superando os números de outros trabalhos de desempenho reprodutivo de *P. vannamei* (CARVALHO; ANDREATTA; FRACALOSSO, 2010; MENEZES, 2019; GALAL; SAID; SHARAF, 2022).

6.2 Análises macroscópicas e histológicas das gônadas

6.2.1 Análises macroscópicas

Nas fêmeas de peneídeos, os ovários se desenvolvem em direção à parte posterior do cefalotórax, e quando maduros tornam-se facilmente identificáveis devido à transparência da carapaça, como uma grande massa alaranjada. O tamanho, cor e textura dos ovários passam por mudanças de acordo com seu grau de amadurecimento. Sua coloração é resultado do acúmulo de vitelogenina contendo pigmentos do tipo carotenoides (PÉREZ-FARFANTE, 1970).

Em nosso estudo, o que ficou evidente é que a coloração se torna mais intensa conforme o nível de maturação. Tons amarelados mais fortes e até alaranjados são predominantes nos estágios dois e três. E esses resultados estão de acordo com outros estudos que se propuseram a comparar colorações gonadais em diferentes estágios de maturação de camarões peneídeos (SIEBERT, 2015; CRAVEIRO, 2018, BERNABÉ *et al.*, 2022; CRAVEIRO *et al.*, 2022).

De acordo com o exposto na seção de resultados, foram observadas fêmeas imaturas para ambos os tratamentos na primeira coleta, o que é um resultado esperado, visto que as fêmeas ainda não haviam passado pelo processo de ablação, cuja função principal é favorecer o desenvolvimento gonadal e maturação. Nesse estágio, assim como observado por Anand *et al.* (2019) e Bae *et al.* (2013), em fêmeas imaturas prevalecem os ovócitos pré-vitelogênicos e oogônias (Figura 18 A e B).

Na quarta coleta, que é referente ao primeiro mês em produção, 100% das fêmeas dos dois tratamentos estavam maduras, de acordo com as análises histológicas (Gráfico 16 A). Esse dado é interessante e em conjunto com os resultados de abortos/desovas não concluídas e taxa de desovas (Gráficos 2 e 3, respectivamente) reforçam a ideia de que a partir do primeiro

mês em produção as fêmeas atingem maior maturidade e melhoram seu desempenho reprodutivo.

Os resultados gerados pela observação histológica revelam que a partir da segunda coleta (quatro dias após ablação), exceto na sexta (terceiro mês em produção), que não diferiu, todos os resultados foram melhores para as fêmeas do grupo alimentado com ração suplementada com óleo de coco, que apresentou maiores taxas de fêmeas maduras quando comparado ao controle (Figura 12 B). Além disso, a nível histológico, as fêmeas do grupo alimentado com ração suplementada com óleo, exibiram nível mais alto de maturação (nível 3) em relação ao controle nas 4^o, 5^o e 6^o coleta.

O nível três, no presente estudo, foi referido como o nível mais elevado de maturação gonadal, sendo aquele em que a gônada está totalmente desenvolvida, apresentando maior espessura, coloração mais forte, preenchendo toda a cavidade abdominal e cefalotorácica. Nesse estágio, considera-se que a fêmea está no seu máximo potencial de desova. Os resultados aqui encontrados mostram que o uso do óleo de coco na ração contribui na elevação do número de fêmeas maduras (Figura 12).

6.2.1.1 Índices gonadossomático e hepatossomático

Os índices hepatossomático e gonadossomático são a relação entre o peso do animal e o peso do hepatopâncreas e gônadas, respectivamente. Os níveis de lipídios na dieta de reprodutores influenciam diretamente nesses índices. Se muito elevados, acima de 8,1%, os níveis lipídicos, de acordo com Wouters *et al.* (2001a), podem afetar negativamente a maturação ovariana, além de não causarem ganhos no IHS e não aumentarem o IGS proporcionalmente ao aumento da taxa de lipídios incorporados à dieta.

Segundo Jasmani *et al.* (2000), em *Penaeus japonicus* (Spence Bate, 1888), durante a maturação, o ovário aumenta seu peso por conta da mobilização de lipídios e proteínas do hepatopâncreas para o interior dos oócitos. Em *Penaeus merguensis* (de Man, 1888), o mesmo foi notado por Phiriyangkul *et al.* (2007), que relatou que o índice gonadossomático (IGS) aumentou durante todo o processo vitelogênico, acarretando maior valor de IGS no estágio mais avançado de maturação gonadal, indicando maior acúmulo de vitelo nos oócitos maduros.

Ao suplementar dieta de reprodutores de *P. vannamei* com vitamina E, Arshadi, Gharaei e Mirdar Harijani (2020) constataram aumento no IGS e nenhuma diferença no IHS. Maneei e colaboradores (2019), ao avaliarem a performance reprodutiva de fêmeas da mesma espécie alimentadas com dietas contendo diferentes quantidades de lecitina de soja, também

não encontraram diferença nos índices hepatossomáticos. No entanto, obtiveram IGS mais elevado em fêmeas que receberam tratamento de 40g/kg de lecitina de soja em sua dieta.

A suplementação dietética de fosfolipídios provenientes do óleo de *krill* na alimentação de *P. vannamei* promoveu a maturação das fêmeas. Nessa pesquisa, Liang *et al.* (2022) notaram índice gonadossomático significativamente maior, bem como acúmulo de lipídios e secreção de estrogênio para as fêmeas do tratamento com óleo de *krill* do que de outras fontes testadas, como lecitina de soja e lecitina de gema de ovo.

O IGS entre os tratamentos só diferiram significativamente na quinta coleta, em que a média foi maior para as fêmeas alimentadas com ração contendo óleo de coco (3,5) que no controle (1,4). Esse resultado é esperado, uma vez que as fêmeas começam a avançar no desenvolvimento gonadal, aumentando assim seu peso corporal e gonadal, e conseqüentemente o índice.

Esses resultados corroboram com os de Jasmani *et al.* (2000), Phiriyangkul *et al.* (2007) e ainda com os de Ceballos-Vázquez *et al.* (2010), que atestaram que o IGS aumenta de acordo com a idade do animal.

6.2.2 Análises histológicas das gônadas

Os efeitos de diferentes dietas fosfolipídicas sobre a maturação ovariana e desempenho reprodutivo de fêmeas de *P. vannamei* foram avaliados por Liang *et al.* (2022). A histologia dos ovários dos camarões em todos os tratamentos experimentais mostrou as características da fase madura, que contém oócitos maduros preenchendo bastonetes corticais. Além disso, fêmeas de camarões alimentadas com dietas suplementadas com fosfolipídios mostraram maior deposição de grânulos de vitelo nos ovócitos do que o controle. Enquanto isso, dietas com óleo de krill e lecitina de gema de ovo promoveram a deposição de grânulos do vitelo de forma mais eficaz do que a dieta de lecitina de soja.

No estudo realizado por Sousa (2017), alimentando o camarão *M. amazonicum* com dietas contendo diferentes fontes de óleo vegetal, a autora constatou que fêmeas alimentadas com dieta contendo óleo de coco exibiram maior quantidade de ovócitos maduros quando comparadas ao controle e aos demais tratamentos que testaram outros óleos. Embora esta autora tenha trabalhado com uma espécie de água doce, que possui hábitos alimentares e necessidades nutricionais diferentes do camarão marinho *P. vannamei*, nossos resultados utilizando dieta suplementada com óleo de coco foram semelhantes ao encontrado por essa autora. Desse modo, infere-se que por mecanismos ainda desconhecidos, o óleo de coco adicionado à ração contribui

para a maior quantidade de ovócitos maduros em fêmeas de camarão, podendo estimular o processo de maturação gonadal.

6.3 Análises histológicas do hepatopâncreas e intestino

O hepatopâncreas nos crustáceos é o órgão responsável pela digestão, assimilação e armazenamento de compostos importantes envolvidos em vários processos metabólicos (RÖSZER, 2014). Quatro tipos celulares são identificados no epitélio de revestimento dos túbulos do hepatopâncreas em decápodes. Os mesmos são classificados como células E (embrionária), R (reabsortivas), F (fibrilar) e B (vesicular), conforme proposto por Jacobs (1928) e Hirsch e Jacobs (1928).

Uma das principais diferenças entre os tipos celulares supracitados é em relação aos seus graus de maturidade. As células embrionárias são imaturas e as demais são maduras. As células embrionárias (E) têm capacidade de transformar-se em qualquer um dos tipos celulares, sendo responsáveis pela renovação celular do epitélio dos túbulos hepatopancreáticos.

As células F sintetizam e secretam zimogênio para realização da digestão extracelular. Em seguida, captam material para a digestão intracelular e se diferenciam em células B. Essas são diferenciadas a partir das células F e estão envolvidas com a digestão intracelular. As células B são as maiores dentre os tipos celulares do hepatopâncreas e apresentam um grande vacúolo envolto por uma fina camada de citoplasma. No final do processo de digestão intracelular as células B estão caracterizadas por grande vacuolização (AL-MOHANNA; NOTT; LANE, 1985).

As células R são o tipo mais abundante nos túbulos hepatopancreáticos dos decápodes, sua função é absorver nutrientes. Essas células absorvem nutrientes solúveis do lúmen do intestino e os estocam sob a forma de lipídios e glicogênio, constituindo-se o principal local de estocagem destes (ICELY; NOTT, 1992).

Um trato intestinal saudável e completo é fundamental para garantir que os camarões apresentem boa capacidade de digestão, absorção e conseqüentemente boa imunidade e desempenho zootécnico. As vilosidades intestinais são estruturas digitiformes da camada mucosa do intestino que atuam na ampliação da superfície desse órgão, otimizando o processo de absorção dos nutrientes. Assim, a integridade das vilosidades intestinais são um fator importante para determinar a capacidade de digestão intestinal e de absorção (PAIVA, 2017; LI *et al.*, 2023).

Nos intestinos das fêmeas analisadas, foi possível notar a presença dessas vilosidades em ambos os tratamentos, em todas as coletas, sem diferenças significativas. Nos mesmos foi também foi possível observar intestino com e sem a presença de microvilosidades em todas as coletas, bem como notar a presença de alimentos e integridade do tecido. Não foram notadas alterações histológicas no intestino de nenhuma das fêmeas analisadas ao longo do experimento. Dessa forma, diante dos resultados obtidos, não podemos afirmar que o uso do óleo de coco interfere na presença de vilosidades ou cause alterações importantes na morfologia intestinal.

6.4 Contagem total de hemócitos

Em crustáceos, a ausência de um sistema imune específico faz com que o sistema inato desses animais desempenhe importante papel na sua defesa. Este sistema inclui respostas humorais e celulares. Os hemócitos circulantes na hemolinfa são responsáveis por essas respostas celulares. Eles consistem em uma barreira celular que defende o organismo contra agentes patogênicos, e quantificar essas células pode possibilitar o estabelecimento de uma relação entre os valores alcançados e as condições sanitárias dos animais avaliados (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2012; EKASARI *et al.*, 2014). Os hemócitos também têm função de produção e estocagem de moléculas antimicrobianas, liberadas em momentos de estresse fisiológicos (JI; YAO; WANG, 2009).

São poucas as informações que dão precisão de valores de referência para a contagem de hemócitos em camarões. Conforme os dados do Centro de Serviços para a Aquicultura (CSA, 2006), as médias de contagens são tidas como boas quando os hemócitos contados imediatamente após a coleta ficam entre 10 e 15 x 10⁶, equivalente a 10 a 15 milhões de cel/mL.

Conforme exposto no Gráfico 11, no presente estudo, os valores médios das contagens variaram entre 390.417 e 2.403.542 cel/mL. De acordo com a referência supracitada todas as nossas contagens estariam fora do padrão considerado bom. No entanto, todas as fêmeas coletadas apresentavam aspecto de animais saudáveis. E a escassez de informações sobre padrões de contagens e suas interpretações não nos permitem comparações mais aprofundadas.

De acordo com Barreto (2009), animais mais jovens apresentam menores concentrações hemocíticas que os mais velhos. Nos dados gerados pelo presente estudo, foi observado que as fêmeas das coletas iniciais, para ambos os tratamentos, apresentaram valores

mais elevados (Gráfico 11). Segundo Barraco (2004), os valores de CTH podem aumentar ou diminuir a depender do tempo de exposição e tipo de estresse. Em processos infecciosos e injúrias, por exemplo, normalmente acontece diminuição nas contagens nas primeiras horas, e depois ocorre aumento, devido à liberação de novas células a partir dos órgãos hematopoiéticos.

Se considerarmos o valor de referência do CSA, nossas CTHs reduzidas podem ser justificadas pelo estresse fisiológico enfrentado pelas fêmeas reprodutoras. A reprodução exige grande esforço da fêmea, desde o ajuste hormonal, transferência de nutrientes para desenvolvimento gonadal, a cópula, o manejo para desova até a devolução aos tanques de origem. Todos esses fatores podem ter influenciado nos valores abaixo do considerado normal.

Nossas contagens mais elevadas foram na primeira coleta, antes da ablação (Gráfico 11). Maggioni *et al.* (2004) afirmam haver uma redução considerável na aglutinação da hemolinfa das fêmeas após o procedimento de retirada do pedúnculo ocular, provavelmente devido ao estresse do processo. Em razão disso, a ablação pode causar uma diminuição da atividade da fenoloxidase e na contagem total de hemócitos (SAINZ-HERNÁNDE *et al.*, 2008). Os dados do presente estudo estão de acordo, pois foi possível notar contagens menores em ambos os tratamentos após a ablação.

Diferenças estatísticas significativas foram detectadas nas coletas quatro e cinco e na média geral, com valores mais elevados nas contagens das fêmeas do tratamento com óleo. Ainda que ambos os tratamentos apresentem valores de CTH inferiores ao desejável, as fêmeas tratadas com óleo demonstraram valores médios melhores, quando comparados ao controle, sugerindo que o óleo de coco pode influenciar benéficamente nas respostas celulares, aumentando a contagem hemocítica.

Ainda que ambos os tratamentos apresentem valores de CTH inferiores ao desejável, as fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo demonstraram valores médios melhores, quando comparados ao controle, sugerindo que o óleo de coco pode influenciar benéficamente nas respostas celulares, aumentando a contagem hemocítica.

Em resposta imunológica, avaliando a contagem total de hemócitos, as fêmeas testadas apresentaram contagens mais satisfatórias que o controle, sugerindo que o óleo de coco pode ter potencial imunoestimulante, e que mais investigações para investigar essa hipótese seriam de grande valia.

6.5 Ganho de peso

O ganho de peso é um importante parâmetro de desempenho zootécnico para animais cultivados. Nossos resultados comungam com os de Sousa (2017), que ao testar e comparar os efeitos da suplementação dietética de *M. amazonicum* com óleos de peixe, linhaça e coco, constatou que dentre esses, o que conferiu maior ganho de peso às fêmeas foi o óleo de coco. Carvalho *et al.* (2020), utilizando o mesmo óleo na nutrição de tambaquis, relataram aumento do ganho de peso em 50%.

A substituição do óleo de peixe por óleo de coco na alimentação de juvenis de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) gerou uma correlação positiva, causando resultados positivos no consumo de ração, conversão alimentar e ganho de peso (APRAKU *et al.*, 2017). Esses resultados somados aos do presente estudo demonstram que o óleo de coco é uma boa recomendação de fonte lipídica que confere excelente ganho de peso aos animais.

Diferente das espécies utilizadas nos estudos supracitados, que trabalharam com espécies de peixes e camarão de água doce, no presente estudo, a espécie utilizada trata-se de um camarão marinho, que em suas necessidades nutricionais requerem ácidos graxos essenciais como EPA e DHA. Esses ácidos graxos não são descritos como sendo encontrados no óleo de coco, que dentre os ácidos requeridos pelo *P. vannamei* só apresenta o ácido linoleico.

Para o tambaqui e tilápia do Nilo, o mecanismo de ação do óleo de coco sobre o ganho de peso torna-se mais facilmente compreensível, uma vez que estas, diferente do *P. vannamei* não necessitam de EPA e DHA e podem suprir suas demandas nutricionais de lipídios a partir de óleos vegetais.

Por este ser o primeiro estudo que se tem registro utilizando óleo de coco na nutrição de reprodutores de *P. vannamei*, e pelo mesmo não ter analisado composição bioquímica do óleo utilizado e dos animais estudados, não fica claro qual o mecanismo de ação e quais componentes do óleo de coco estão envolvidos no considerável ganho de peso obtidos pelos animais alimentados com dieta suplementada com esse óleo. O que fica evidente pelo resultado exibido no gráfico 12, é que de fato o óleo de coco confere resultados positivos no parâmetro ganho de peso. Como esta é um importante medida de desempenho zootécnico, e uma das que mais interessam aos produtores, será de grande valia que mais estudos testando essa fonte de lipídios sejam realizados a fim de melhor compreender como este óleo atua nesse parâmetro.

6.6 Expressão gênica

6.6.1 Expressão de genes relacionados à imunidade

A enzima superóxido dismutase (SOD) constitui a primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio, que desempenha um papel crucial na célula contra o estresse oxidativo por meio da modulação direta das quantidades de oxigênio e peróxido de hidrogênio (ZHANG *et al.*, 2019).

A expressão e síntese de Proteínas de Choque Térmico (HSP), por sua vez, fazem parte da resposta celular ao estresse físico e/ou químico. Elas atuam como acompanhantes moleculares, mantendo a homeostase e agindo contra os efeitos proteotóxicos. *Hsp70* desempenha papéis importantes na resistência ao estresse ambiental e na estimulação do sistema imunológico inato. *HSPs* são altamente expressas em hemócitos e em quase todos os tecidos, incluindo músculo, estômago, coração, hepatopâncreas, ovários e brânquias. O aumento da expressão de *HSPs*, particularmente *Hsp70*, é considerado um bom biomarcador de alterações na atividade metabólica (ZHENYU; CHUANZHEN; JIANHAI, 2004; VALENTIM-NETO *et al.*, 2014).

De acordo com Chen *et al.* (2018), o ovário é um órgão importante de expressão de mRNA de *HSPs*. Os níveis de mRNA de *Hsp40* aumentam continuamente durante o desenvolvimento gonadal, enquanto os de *Hsp70* se mantêm elevados, mas com menos variações.

As super expressão de *Hsp70* nas últimas coletas (Gráfico 20 E e F) podem estar relacionadas aos picos de produção das fêmeas, pois conforme exibido nos gráficos relacionados ao desempenho reprodutivo apresentados na seção 5.1, os segundo e terceiro mês em produção foram aqueles em que os maiores valores de taxas de cópulas e desovas foram atingidos. A reprodução é um processo fisiológico que demanda muita energia dos animais, podendo ser causa de estresse. Como essas proteínas estão também diretamente relacionadas à resposta celular ao estresse físico, a superexpressão nessas últimas coletas pode ter sido ocasionada pelo maior desempenho reprodutivo.

6.6.2 Expressão de genes relacionados à nutrição

Entre as proteases específicas, uma das mais abundantes enzimas proteolíticas em camarões peneídeos é a tripsina, responsável pela maior parte da digestão de proteínas da alimentação dos camarões (LEMOS; EZQUERRA; GARCIA-CARREÑO, 2000). As lipases, por sua vez, são responsáveis pela hidrólise dos triacilgliceróis da dieta gerando glicerol e

ácidos graxos que são absorvidos e usados para síntese de moléculas ou para geração de energia (LEHNINGER; COX, 2014).

Para o gene *Lipase* não ocorreu amplificação no tecido ovariano das fêmeas avaliadas. Este gene atua na digestão, então por sua função, espera-se que realmente sua expressão ocorra em tecidos mais associados a esta atividade. No entanto, em recente estudo, Cai *et al.* (2024), fazem uma abordagem sobre uma lipase específica que atua na regulação de hormônios sexuais e no desenvolvimento gonadal do camarão *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849). Os autores notaram níveis de expressão mais elevados no hepatopâncreas, gânglio cerebral e testículos, indicando o potencial envolvimento do *Mn-LIPA* na diferenciação sexual e no desenvolvimento gonadal. Nesse mesmo estudo, os autores relatam ainda a escassez de estudos sobre os genes dessa família em crustáceos.

6.6.3 Expressão de genes relacionados à maturação/reprodução

Em camarões peneídeos, o desenvolvimento ovariano é caracterizado pelo acúmulo de uma importante proteína vitelina e pela formação de bastonetes nos oócitos. O precursor da vitelina, a vitelogenina (Vtg), é sintetizado no ovário e no hepatopâncreas, transportado para os oócitos, e se acumulam no ooplasma como vitelina para utilização como uma fonte nutritiva durante a embriogênese. Após a conclusão do acúmulo de vitelo, as hastes corticais são formadas radialmente em torno da periferia da membrana plasmática do oócito e os oócitos maduros são gerados. Receptor de vitelogenina, hormônio inibidor da vitelogenina (VIH) e proteínas corticais de bastonete (CRP), foram identificadas em *P. monodon* e podem ser usado como indicador de maturação do ovário (ROTLLANT *et al.*, 2015).

Nos estudos de Ventura-López *et al.* (2016) foi relatado que os transcritos do receptor gama de progestina da membrana (*mprg*) são altamente expressos no hepatopâncreas e intestino. Foi ainda descoberto uma super expressão apenas em gônadas de fêmeas adultas, mas não em gônadas de machos adultos ou em gônadas de machos e fêmeas não maduros.

Em nossas análises utilizando tecido ovariano e hepatopâncreas, não ocorreu amplificação nas amostras de ovários do controle. Entretanto, para o grupo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo, houve expressão nas primeira (antes da ablação), segunda (quatro dias após ablação) e sexta (terceiro mês em produção) coletas, sendo nesta última o pico de expressão (Figura 22 J). Esses dados corroboram com os dos autores supracitados, que relatam que a concentração de receptores de progestina aumenta durante a maturação do oócito, encontrando os níveis mais altos de receptores quando o estágio de

maturação mais avançada é alcançado. Esses dados revelam a importância do gene *mprg* no hepatopâncreas, indicando que o receptor de progesterona atua também em outros tecidos além das gônadas das fêmeas.

A vitelogenina é uma molécula de armazenamento, cuja função principal é fornecer nutrientes, energia e matéria-prima aos oócitos em desenvolvimento para o crescimento embrionário e larval. Durante a maturação das fêmeas, o ovário sofre rápida vitelogênese a partir da síntese de uma grande quantidade dessa proteína, que é a principal do vitelo (BISCOTTI *et al.*, 2018).

Poucos estudos dedicaram-se a estudar a expressão e ação do gene receptor de vitelogenina (*vtgr*) em fêmeas de *P. vannamei*. Ventura-López *et al.* (2017) detectaram a expressão dos transcritos desse gene em ovários e intestino. Relataram que a expressão de *vtgr* foi maior nos estágios pré-vitelogênicos, diminuindo no final do processo de maturação.

Trabalhando com *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849), Bai *et al.* (2015) notaram que a inibição do *vtgr* resultou em uma expressão diminuída das proteínas do vitelo e do diâmetro do oócito, interrompendo o desenvolvimento gonadal. Observaram ainda que o silenciamento gênico pós-transcricional do *vtgr* por RNAi retardou a maturação gonadal, mantendo os oócitos no estágio pré-vitelogênico.

No estudo de Feijó *et al.* (2016), utilizando RNAi para silenciamento gênico dos transcritos de GIH em fêmeas de *P. vannamei*, os autores relataram o aumento da expressão do mRNA de *vtg* nos ovários das fêmeas após ablação. Notaram ainda que utilizando as duplas fitas de RNA que visavam silenciar o hormônio inibidor e favorecer a maturação sem utilização da ablação, o aumento da expressão ocorreu no 37º após a injeção com dsRNA-GIH.

Assim como no estudo supracitado, no presente trabalho, os níveis dos transcritos do mRNA de *vtg* também aumentaram após ablação (Figura 23 N e O). O aumento pôde ser notado tanto nos ovários quanto no hepatopâncreas, apresentando visualmente maior regulação positiva no primeiro tecido. Raviv *et al.* (2006) também já haviam constatado maior expressão de *vtg* nos ovários quando comparados ao hepatopâncreas.

Apesar das desvantagens já conhecidas do processo de ablação (BAE *et al.*, 2013; DAS *et al.*, 2015), e também das tentativas de empregar novas técnicas ou formas de manejo menos agressivas aos animais e que também confirmam estímulo à maturação (Feijó *et al.* (2016); Menezes (2019) e Zacarias *et al.* (2019)), a ablação ainda é uma técnica amplamente utilizada e que confere efeitos positivos e comprovados no que diz respeito à promoção da maturação e regulação positiva de genes importantes envolvidos no processo, como a vitelogenina, conforme foi demonstrado também no presente estudo.

Alimentos e hormônios têm sido explorados para promoção de maturação e desova em fêmeas de camarões cultivados, e foram verificados os efeitos de alguns hormônios importantes, incluindo estradiol, progesterona e hidroxiprogesterona na maturação gonadal. Os alimentos são uma importante fonte de nutrientes, e fornecem não apenas nutrição suficiente para o desenvolvimento gonadal, síntese do vitelo e maturação, mas também precursores suficientes para sintetizar alguns hormônios importantes para o camarão (YANG *et al.*, 2022).

Dietas contendo ingredientes que estimulem o desenvolvimento gonadal podem ser também uma alternativa ao uso da ablação. No presente estudo, trabalhou-se com fêmeas abladas, e foi observado que para o gene da vitelogenina, precursora do vitelo, e com papel crucial na vitelogênese, os transcritos do mesmo foram regulados positivamente, inferindo que a adição do óleo de coco conferiu influência positiva. Testar a utilização do mesmo óleo em fêmeas não abladas é uma possibilidade.

Conforme relatado por Tseng *et al.* (2002), o hepatopâncreas, assim como os ovários, também é sítio de produção de vitelogenina. No estudo de Maneii *et al.* (2019), houve uma maior expressão do gene *vtg* hepatopancreático, indicado pelo aumento da abundância do transcrito do mRNA do *vtg* em fêmeas alimentadas com a dieta contendo lecitina de soja, indicando que o desenvolvimento secundário de oócitos e subsequente maturação ovariana é induzida pela inclusão desse suplemento na dieta.

Assim como nos achados de Maneii *et al.* (2019) testando diferentes concentrações de lecitina de soja na dieta fêmeas de *P. vannamei*, nossos resultados indicam que a dieta interfere diretamente na regulação de importantes genes relacionados à reprodução e maturação, e a inclusão de óleo de coco na dieta favorece a expressão de vitelogenina e consequentemente, a maturação ovariana. Essa afirmação está apoiada também nos resultados apresentados nas seções anteriores (5.2 e 5.3).

Há ainda, uma relação direta desse maior desenvolvimento gonadal nas fêmeas, com a regulação gênica apresentada. Os genes voltados à reprodução foram regulados positivamente nas fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco. Já os relacionados ao estresse e imunidade, nas primeiras coletas foram mais expressos no controle, e regulados positivamente nas fêmeas do grupo óleo nas coletas finais, o que pode ser justificado por sua maior produtividade também no mesmo período, o que causa maior estresse fisiológico, e regulação positiva desses genes. *Tripsina* e *lipase* também foram regulados positivamente nas coletas finais, quando os animais estavam há mais tempo em produção e com as fêmeas tratadas apresentando maior produtividade, o que pode sugerir que quanto à regulação de genes ligados à nutrição, os efeitos de regulação se apresentem mais tardiamente.

6.7 Desempenho geral

Todas as diferenças encontradas na maioria dos parâmetros analisados representam efeitos positivos causados pela adição do óleo de coco à ração ofertada às fêmeas do grupo testado. Os dados do presente estudo estão de acordo com os obtidos por outros pesquisadores que testaram óleos de origem vegetal na dieta de organismos aquáticos, em sua maioria, de água doce, e também alcançaram resultados satisfatórios (APRAKU *et al.*, 2017; SOUSA, 2017; MANEII *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2020).

Os ganhos no desempenho reprodutivo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco, bem como a modulação dos genes analisados foram mais evidentes a partir do segundo mês em produção. Essa observação pode sugerir que os efeitos benéficos causados pelo uso do óleo de coco necessitam de um tempo prévio de oferta para se manifestarem. Com base nisso, uma alternativa seria suplementar com óleo de coco a dieta dos camarões que virão a ser reprodutores, ainda nos viveiros de cultivo, a fim de que os efeitos positivos sejam expressos desde a entrada dos animais no setor de maturação e início da produção.

Os resultados aqui apresentados indicam que, embora ainda não seja conhecido com maiores detalhes, a nível bioquímico e molecular como o óleo de coco pode impactar no desempenho zootécnico e reprodutivo de espécies marinhas como o *P. vannamei*, é válido considerar o óleo de coco como uma fonte com potencial de inclusão na alimentação desses camarões. Esse óleo é uma rica fonte de vitaminas lipossolúveis. Dentre elas, a vitamina E, que de acordo com Arshadi, Gharaei e Mirdar (2020) tem relevante papel na reprodução de *P. vannamei*. Os autores notaram impacto positivo no desempenho reprodutivo e expressão de vitelogenina em fêmeas alimentadas com dietas suplementadas com vitamina E na concentração de 300 mg/kg quando comparadas ao controle, e demais tratamentos (0, 100 e 500 mg/kg).

Em estudo realizado por Darvishpour *et al.* (2012), os resultados obtidos indicam que a vitamina E desempenha importante papel na sobrevivência e crescimento de pós larvas de *P. vannamei*. No presente estudo, o grupo alimentando com ração contendo óleo de coco, que é rico nesta vitamina, as fêmeas exibiram maior ganho de peso quando comparadas ao controle. Em machos reprodutores da espécie *P. vannamei*, Montalvo *et al.* (2022) constataram que a suplementação da dieta com 620 mg/kg de vitamina E conferiu benefícios na reprodução,

relacionados à quantidade de espermatozoides e nas respostas dos genes lipídicos e imunológicos avaliados.

Na reprodução de humanos, a vitamina E auxilia na produção de hormônios importantes na fertilidade feminina e masculina, atuando ainda na proteção contra mutações nos espermatozoides, além de ser um importante antioxidante. A presença dessa vitamina no óleo de coco utilizado no presente estudo pode ter sido um dos elementos que contribuíram para a melhora do desempenho reprodutivo nas fêmeas analisadas. Além de que o bom desempenho, aqui avaliado pelo número de cópulas, desovas e náuplios, depende diretamente também da participação ativa dos machos reprodutores e da qualidade de seus espermatozoides. Parâmetros associados ao desempenho dos machos que também receberam a dieta suplementada com óleo de coco não foram avaliados, no entanto, também são de importante avaliação.

De acordo com González-Félix *et al.* (2003), as exigências do camarão marinho *P. vannamei* por ácidos graxos essenciais são supridas com ácidos graxos altamente insaturados (HUFA) das séries n-3 e n-6. Esses ácidos são: eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenóico (DHA) e araquidônico (ARA) e os ácidos graxos poliinsaturados linoleico (LA) e linolênico (LNA). Destes, apenas o LA é encontrado no óleo de coco.

Os ácidos LA e LNA, isoladamente ou em combinação, não conferem melhoras significativas no crescimento de *P. vannamei* (GONZÁLEZ-FÉLIZ *et al.*, 2003). No entanto, o LA quando combinado com outros ácidos, como o ARA, melhoram a taxa de crescimento específico e ganho de peso, além de conferir efeitos positivos sobre a biossíntese de EPA, na capacidade antioxidante e imunidade de *P. vannamei* (ZHU *et al.*, 2023).

São escassos os estudos e relatos da relação do LA com a reprodução de camarões. Em pesquisa conduzida por Palacios *et al.* (2002), níveis mais elevados de ácido linoleico (18:2n-6) nos ovos de *P. vannamei* foram associados à melhoria da sobrevivência na fase de Zoea III, e conferiram maiores sobrevivências nas desovas. Em nosso estudo, não foram feitas análises aprofundadas que investigassem os níveis de LA na dieta e/ou nos animais e suas proles. No entanto, maiores taxas de eclosão e maior número de náuplios foram registrados no grupo das fêmeas alimentadas com ração suplementada com óleo de coco. Este pode ser um dos fatores ainda não elucidados, por trás dos resultados satisfatórios obtidos no presente experimento.

O ácido graxo encontrado em maior concentração no óleo de coco é o ácido láurico (45-53%). Esse ácido, assim como o caprílico e o cáprico são classificados como ácidos graxos de cadeia média. Na espécie de peixe *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758), o ácido láurico extraído do óleo de coco e incluído à dieta aumentou a ingestão de ração e a taxa de crescimento da

dourada (SIMÓ-MIRABET *et al.*, 2017). Segundo Su *et al.* (2014), a adição de ácidos graxos de cadeia média à ração pode melhorar significativamente o ganho de peso do camarão *P. vannamei*. Poucos estudos avaliam o ácido láurico e outros ácidos da mesma classe como fonte lipídica principal. Nenhum estudo que reportasse os efeitos de suplementação de ácido láurico sob a reprodução de camarões foi encontrado. Os estudos com esse ácido graxo relacionados à reprodução ainda são bem preliminares e foram registrados apenas com camundongos, melhorando o desenvolvimento mamário para promover a função de lactação em fêmeas (YANG *et al.*, 2020). Em machos, melhora o perfil hormonal, as propriedades antioxidantes, a qualidade do esperma e as alterações histomorfométricas nos testículos e epidídimos de ratos com infertilidade diabética (ANUAR *et al.*, 2023).

Apesar de o óleo de coco não conter em sua composição os ácidos graxos essenciais a nutrição desta espécie, adicioná-lo à ração não causou prejuízos aparentes, pelo contrário, aumentou taxas importantes de desempenho. Assim, essa fonte lipídica pode ser usada com essas finalidades, para suplementar, enriquecendo a dieta dos camarões cultivados. Para isso, estudos adicionais voltados à nutrição, elaboração de dietas com este ingrediente, bem como análises de outros parâmetros aqui não avaliados serão de grande valia.

7 CONCLUSÃO

Esse é o primeiro estudo utilizando óleo de *Cocos nucifera* na alimentação de reprodutores de *P. vannamei* e obtivemos resultados satisfatórios no desempenho reprodutivo das fêmeas analisadas. A partir desses podemos concluir que o óleo de coco é uma fonte lipídica que tem potencial para ser incorporada à dieta de reprodutores de *P. vannamei*. Essa afirmação se apoia no maior potencial de desovas e maior número de náuplios apresentados pelas fêmeas, bem como na regulação de importantes genes relacionados à vitelogênese e maturação. Para o setor produtivo, mais especificamente o setor de maturação, a capacidade produtiva da fêmea e o número de náuplios por ela gerado é um dos dados de desempenho mais importantes. Os resultados encontrados nesta pesquisa mostram que o uso do óleo contribui para o melhoramento desse parâmetro.

Analisando os resultados obtidos foi possível constatar o impacto positivo do uso do óleo no desenvolvimento gonadal, por meio das análises macroscópicas, histológicas e IGS, onde as fêmeas alimentadas com dieta suplementada com óleo de coco apresentaram maior número de fêmeas maduras.

Quanto à produtividade das fêmeas, tendo como produto final, o número de náuplios, concluiu-se que o ápice foi no 3º mês em produção e que há diferença na produtividade ao longo dos meses de cultivo. O óleo de coco potencializou esse parâmetro nas fêmeas alimentadas com ração suplementada com ele.

Sobre os aspectos nutricionais, foi registrado maior ganho de peso nos animais alimentados com ração contendo óleo de coco. Este é um importante resultado de desempenho zootécnico, que introduz as perspectivas futuras levantadas a partir desse estudo.

Diante do exposto e dos resultados positivos obtidos, espera-se que esse estudo motive a realização de novas pesquisas que testem a formulação de dietas, incluindo essa fonte de óleo vegetal. Ademais, será de grande relevância que o óleo de coco seja testado também em outras fases de vida de *P. vannamei*, principalmente aquelas em que se deseja otimizar o ganho de peso. Estudos mais aprofundados sobre a composição do presente óleo, e também seus efeitos sobre outros parâmetros de desempenho zootécnicos e reprodutivos, capacidade imunostimulante e antimicrobiana são algumas das inúmeras linhas de pesquisa a serem exploradas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, E. M. *et al.* Impact of Dietary Administration of Seaweed Polysaccharide on Growth, Microbial Abundance, and Growth and Immune-Related Genes Expression of The Pacific Whiteleg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Life**, [S.l.], v. 13, n. 2, p. 344, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-1729/13/2/344>. Acesso em: 01 fev. 2023.
- ALFARO-MONTOYA, J.; BRAGA, A.; UMAÑA-CASTRO, R. Research frontiers in penaeid shrimp reproduction: Future trends to improve commercial production. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 503, p. 70-87, mar. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848618322853>. Acesso em: 20 fev. 2022.
- AL-MOHANNA, S.; NOTT, J.; LANE, D. Mitotic E- and secretory F-cells in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* (Crustacea:Decapoda). **Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom**, [S.l.], v. 65, p. 901-910, 1985. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-the-marine-biological-association-of-the-united-kingdom/article/abs/mitotic-e-and-secretory-f-cells-in-the-hepatopancreas-of-the-shrimp-penaeus-semisulcatus-crustacea-decapoda/420682B207032E2D008F7FCEDF2FC8A3#access-block>. Acesso em: 07 abr. 2024.
- ANAND, P. *et al.* Reproductive Performance of Wild Brooders of Indian White Shrimp, *Penaeus indicus*: potential and challenges for selective breeding program. **Journal Of Coastal Research**, [S.l.], v. 86, n. 1, p. 65, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/337094233_Reproductive_Performance_of_Wild_Brooders_of_Indian_White_Shrimp_Penaeus_indicus_Potential_and_Challenges_for_Selective_Breeding_Program. Acesso em: 05 abr. 2023.
- ANDREATA, E. R.; BELTRAME, E. Cultivo de camarões marinhos. In: POLI, C. R. *et al.* **Aquicultura**: experiências brasileiras. Florianópolis, SC: Multitarefa Editora Ltda, 2004. 456 p.
- ANDRIANTAHINA, F. *et al.* Comparison of reproductive performance and offspring quality of domesticated Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, [S.l.], v. 324-325, p. 194-200, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848611008398>. Acesso em 16 mar. 2023.
- ANUAR, N. *et al.* Lauric acid improves hormonal profiles, antioxidant properties, sperm quality and histomorphometric changes in testis and epididymis of streptozotocin-induced diabetic infertility rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S.l.], v. 470, p. 116558, 2023. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041008X23001977?via%3Dihub>. Acesso em: 16 jun. 2024.

APRAKU, A. *et al.* Evaluation of blended virgin coconut oil and fish oil on growth performance and resistance to *Streptococcus iniae* challenge of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Egyptian journal of basic and applied sciences**, v. 4, n. 3, p. 175-184, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2314808X17302026>. Acesso em 13 abr. 2024.

ARCOS, F. *et al.* Feasible predictive criteria for reproductive performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. **Aquaculture**, [S.l.], v. 228, n. 1-4, p. 335-349, 2003. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/223553823_Feasible_predictive_criteria_for_reproductive_performance_of_white_shrimp_Litopenaeus_vannamei. Acesso em: 01 abr. 2024.

ARSHADI, A.; GHARAEI, A.; MIRDAR, J. Effect of dietary vitamin E on reproductive performance and vitellogenin gene expression in broodstock of *Litopenaeus vannamei*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, [S.l.], v. 19, n.5, p. 2475 -2492, 2020. Disponível em: <https://jifro.ir/article-1-3814-fa.pdf>. Acesso em 04 jun. 2024.

AYUB, Z; AHMED. A description of the ovarian development stages of penaeid shrimps from the coast of Pakistan. **Aquaculture Research**, Paquistão, v. 33, n. 10, p.767-776, 2002. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-2109.2002.00715.x>. Acesso em: 12 mai. 2022.

BAE, S-H *et al.* Alterations of pattern in immune response and vitellogenesis during induced ovarian development by unilateral and bilateral ablation in *Litopenaeus vannamei*. **Fisheries Science**, [S.l.], v. 79, n. 6, p. 895-903, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12562-013-0652-3>. Acesso em 05 jan. 2023.

BAI, H. *et al.* Molecular characterization and developmental expression of vitellogenin in the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* and the effects of RNA interference and eyestalk ablation on ovarian maturation. **Gene**, [S.l.], v. 562, n. 1, p. 22-31, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25499697/>. Acesso em: 12 mar. 2024.

BARBIERI JÚNIOR, R.C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos**: Reprodução, Maturação e Larvicultura. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2001. 255 p.

BARBIERI JÚNIOR, R.C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos**: engorda. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2002. 352 p.

BARRACO, M. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos. *In*: RANZANU-PAIVA, M et al. (Org.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p.51-73.

BARRETO, A. C. G. **Contagem total de hemócitos de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)**. 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

BISCOTTI, M. *et al.* New Perspectives on the Evolutionary History of Vitellogenin Gene Family in Vertebrates. **Genome Biology And Evolution**, [S.l.], v. 10, n. 10, p. 2709-2715, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30239716/>. Acesso em: 29 mar. 2024.

BELL, T. A; LIGHTNER, D. V. A handbook of normal penaeid shrimp histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, **Louisiana**, p. 114, 1988.

BERNABÉ, C. *et al.* Ovarian development of *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea: penaeidae) from espírito santo, southeastern brazil. **Brazilian Journal Of Biology**, [S. l.], v. 82, n. 1, p. 1-10, dez. 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/GqTWY73vrknbGWQjMdf3bNx/abstract/?lang=en>. Acesso em 28 mar. 2024.

BOLOGNINI, L. *et al.* A multidisciplinary approach to study the reproductive biology of wild prawns. **Scientific Reports nature**, [S. l.], v. 7, n. 16781, p. 1-12, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-16894-1>. Acesso em: 27 ago. 2022.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 597–601, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956331>. Acesso em: 30 jan. 2023.

BUTTOW, M. V.; BONOW. S. Estudos de Expressão Gênica e Possibilidades de Aplicação no Melhoramento Genético de Pessegueiro [*Prunus pérsica* (L.) Batsch]. **Embrapa clima temperado**, Pelotas, p. 27, 2013. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/991617/1/documento370web.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2023.

CAHU, C. *et al.* Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets. **Aquaculture**, [S.l.], v. 126, n. 1-2, p. 159-170, 1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0044848694902577?via%3Dihub>. Acesso em: 12 fev. 2023.

CAI, P. *et al.* Role of Mn-LIPA in Sex Hormone Regulation and Gonadal Development in the Oriental River Prawn, *Macrobrachium nipponense*. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 25, p. 1399, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/3/1399>. Acesso em 13 abr. 2024.

CARVALHO, A. *et al.* **Avaliação in vivo do óleo de coco na nutrição de tambaquis.** Aracajú, 2020. Aracajú: Anais do X Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2020.

CARVALHO, F. G.; ANDREATTA, E. R.; FRACALOSSI, D. M. AVALIAÇÃO DA GÔNADA DE PEIXE MARINHO E DA BIOMASSA DE *Artemia* sp. COMO ITENS ALIMENTARES SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE *Litopenaeus vannamei*. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 2, n. 36, p. 111-121, jul. 2010. Disponível em: <https://journals.indexcopernicus.com/search/article?articleId=538086>. Acesso em 05 fev. 2024.

CAVALCANTE, L. V. Os novos espaços da produção de coco no Ceará: um olhar para os perímetros irrigados. **Sociedade e Território**, Natal, v. 27, p. 289-308, 2015.

CAVALLI, R. *et al.* Variations in lipid classes and fatty acid content in tissues of wild *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) females during maturation. **Aquaculture**, [S. l.], v. 193, n. 3, p. 311-324, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004484860000497X>. Acesso em: 14 nov. 2022.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Crustacean immune responses and their implications for disease control. In: B. Austin (Ed.); **Infectious Disease in Aquaculture**, p.69–87, 2012. Cambridge: Elsevier. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780857090164500027>. Acesso 12 fev. 2024.

CHANG, C. F.; SHIH, T. W. Productive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. **Invertebrate Reproduction and Development**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 11-20, 1995. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07924259.1995.9672429>. Acesso em: 12 set. 2022.

CHEN, T. *et al.* Heat Shock Protein 40 (HSP40) in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*): molecular cloning, tissue distribution and ontogeny, response to temperature, acidity/alkalinity and salinity stresses, and potential role in ovarian development. **Frontiers In Physiology**, [S. l.], v. 9, p. 1-13, 12 dez. 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2018.01784/full>. Acesso em: 02 abr. 2024.

CHEN, Y. *et al.* Effects of dietary fish oil replacement by soybean oil and l-carnitine supplementation on growth performance, fatty acid composition, lipid metabolism and liver health of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. **Aquaculture**, [S.l.], v. 516, 2020.

CHEN, Z. *et al.* Study of effects of dietary quercetin (Que) on growth performance and disease resistance mechanism of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, [S.l.], v. 563, p. 1-11, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848622010043>. Acesso em: 30 jan. 2023.

CORDEIRO-JUNIOR, E. L. **Concentrado proteico de soja e óleo de soja em rações experimentais para o camarão marinho *Litopenaeus vannamei***. 2011, 64 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CORRAL-ROSALES, D. *et al.* Modulation of reproductive exhaustion using *Ulva clathrata* in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) broodstock during commercial maturation. **Aquaculture Research**, [S.l.], v. 49, n. 12, p. 3711-3722, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/327910957_Modulation_of_reproductive_exhaustion_using_Ulva_clathrata_in_Pacific_white_shrimp_Litopenaeus_vannamei_Boone_1931_broodstock_during_commercial_maturation. Acesso em 08 jan. 2023.

COUTO, M. V. S. *et al.* Óleo de coco virgem como nutracêutico na ração do tambaqui. **EMBRAPA**, Aracaju, v. 244, p. 1-7, 2021. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/228986/1/COT-244-21-Embrapa-Tabuleiros-Costeiros-1.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2023.

COZER, N.; ROSSI, V. G. Camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Divulgação Científica**, Curitiba, 2016. Disponível em: <https://gia.org.br/portal/camarao-marinho-litopenaeus-vannamei-boone-1931/>. Acesso em: 09 jan. 2023.

CRAVEIRO, C. F. F. **Aspectos reprodutivos dos camarões peneídeos *Litopenaeus schmitti* e *Farfantepenaeus subtilis* capturados em Lucena, litoral norte da Paraíba, Brasil**. 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

CRAVEIRO, C. *et al.* Ovarian maturation of *Penaeus subtilis* (Decapoda: Penaeidae): A new insight to describe oocyte development and somatic structures. **Acta Zoologica**, [S. l.], p. 1-10, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/azo.12433>. Acesso em: 14 nov. 2023.

CYRINO, J. E. P. *et al.* A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S. l.], v. 39, p. 68–87, 2010. Disponível em: <https://www.scienceopen.com/document?vid=11730289-b7ba-42e4-bd7e-dbf4db0d3df>. Acesso em: 14 set. 2022.

DALL, W. *et al.* The Biology of the Penaeidae. In: **Advances in Marine Biology**. London: Academic Express, v. 27, 1990. 489 p. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/bookseries/advances-inmarinebiology/vol/27/suppl/C>. Acesso em: 16 nov. 2022.

DARVISHPOUR, H. *et al.* Effects of Vitamins A, C, E and their Combination on Growth and Survival of *Litopenaeus vannamei* Post Larvae. **Advanced Studies in Biology**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 2245-2253, 2012. Disponível em: <https://www.m-hikari.com/asb/asb2012/asb5-8-2012/darvishpourASB5-8-2012.pdf>. Acesso em 12 jun. 2024.

DAS, R. *et al.* Captive maturation studies in *Penaeus monodon* by GIH silencing using constitutively expressed long hairpin RNA. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 448, p. 512-520, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848615300752>. Acesso em: 07 mai. 2024.

DUAN, Y. *et al.* Changes in the Intestine Microbial, Digestive, and Immune-Related Genes of *Litopenaeus vannamei* in Response to Dietary Probiotic *Clostridium butyricum* Supplementation. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. 2191, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6156435/>. Acesso em: 01 fev. 2023.

EKASARI, J. *et al.* Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish & shellfish immunology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 332–339, 2014. Disponível em: <https://www.comm.toronto.edu/~bkf/pessoal/2014b.pdf>. Acesso em: 01 abr. 2024.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). O agro no Brasil e no mundo: uma síntese do período de 2000 a 2020. **EMBRAPA SIRE**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/10180/62618376/O+AGRO+NO+BRASIL+E+NO+MUNDO.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2023.

EMERENCIANO, M. *et al.* Effect of short-term fresh food supplementation on reproductive performance, biochemical composition, and fatty acid profile of *Litopenaeus vannamei* (Boone) reared under biofloc conditions. **Aquaculture International**, [S. l.] v. 21, n. 5, p. 987-1007, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-012-9607-4>. Acesso em: 13 mai. 2024.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020**. La sostenibilidad en acción. Roma, Itália. 2020. 200 p. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca9229es>. Acesso em: 16 de jan. 2023.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2024**. Blue transformation in action. Rome, Itália, 2024. 264 p. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/items/467191e5-111b-4191-a4d3-843e491fd418>. Acesso em: 11 jun. 2024.

FEIJÓ, R. *et al.* Silencing of Gonad-Inhibiting Hormone Transcripts in *Litopenaeus vannamei* Females by use of the RNA Interference Technology. **Marine Biotechnology**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 117-123, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26573611/>. Acesso em: 07 mai. 2024.

FREITAS, J. O. **Expressão de genes imunológicos em camarões *Litopenaeus vannamei* desafiados experimentalmente com o vírus da mionecrose infecciosa e tratados com dsRNA produzidas *in vivo***. 2020, 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) –

Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/53736>. Acesso em: 14 nov. 2023.

FUKUDA, B.; BERTINI, G.; ALMEIDA, L.. Effect of salinity on the embryonic development of *Macrobrachium acanthurus* (Decapoda: palaemonidae). **Invertebrate Reproduction & Development**, [S.l.], v. 61, n. 1, p. 1-8, 2016. Disponível: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07924259.2016.1244572>. Acesso em 15 mai. 2024.

FURTADO NETO, M. A. A. Reprodução e genética de camarões marinhos em cativeiro. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 8, p. 387-388, 2014.

GALAL, A.; SAID, M.; SHARAF, S. Reproductive Studies on Preparation of Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Broodstock in Commercial Hatcheries. **Journal of Animal, Poultry & Fish Production**, Suez Canal University, v. 11, p. 35-42, 2022. Disponível em: https://japfp.journals.ekb.eg/article_284091_105b6631d5111fa71e01b886b2022727.pdf. Acesso em 30 mar. 2024.

GAGLIARDI, T. R. **Imunidade intestinal em camarões *Litopenaeus vannamei*: expressão gênica espacial e o efeito da via de infecção pelo WSSV**. 2020, 104 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

GLENCROSS, Brett. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. **Reviews in Aquaculture**, [S.l.], v. 1, 71–124, 2009.

GOMEZ-ANDURO, G. *et al.* A superóxido dismutase citosólica de manganês do camarão *Litopenaeus vannamei*: clonagem molecular e expressão. **Jornal Dev. Comp. Imunol.**, [S.l.], v. 30, p. 893-900, (2006).

GONG, H. *et al.* Nuevos avances en el estudio de fosfolípidos nutrimentales para canarón. In: CRUZ SUÁREZ, L.E *et al.* **Avances en Nutrición Acuícola VII**. Hermosillo, Sonora, México: Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 2004. p. 329-343.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M. *et al.* Growth, survival and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and absence of phospholipids. **Aquaculture**, [S.l.], v. 205, n. 3-4, p. 325-343, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848601006846>. Acesso em: 18 out. 2022.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L. *et al.* Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: I. Effect of dietary linoleic and linolenic acids at different concentrations and ratios on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid composition. **Aquaculture Nutrition**, [S.l.], v. 9, p. 105-113, 2003. Disponível em: <https://docs.google.com/document/d/1gdFOPMGxJcWRECwIo9DKJIFo7pN4UPdv/edit>. Acesso em 10 jun. 2024.

HIRSCH, G; JACOBS, W. Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. I. Teil: Methodik und Technik, 1928. In: Icely, J.D. e Nott, J.A.

Digestion and Absorption: digestive system and associated organs. **Microscopic Anatomy of Invertebrates**, [S.l.], v. 10, p. 147-201, 1992. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00337897>. Acesso em 13 ago. 2023.

ICELY, J.; NOTT, J. Digestion and Absorption: digestive system and associated organs. **Microscopic Anatomy of Invertebrates**, [S.l.], v. 10, p. 147-201, 1992. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00337897>. Acesso em 13 ago. 2023.

JACOBS, W. (1928) Untersuchungen über die Cytologie der Seretbildung in der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. In: Icelly, J. D. Nott, J. A. **Digestion and Absorption: digestive system and associated organs**. Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 10: Decapod Crustacea, p. 147-201, 1992. Disponível em: <https://www.scielo.cl/pdf/ijmorphol/v27n1/art22.pdf>. Acesso em 14 ago. 2023.

JAMAL, M. *et al.* Probióticos como medidas alternativas de controle na aquicultura de camarão: uma revisão. **J App Biol Biotecnologia**, v. 7, p.69-77, 2019. Disponível em: https://jabonline.in/abstract.php?article_id=339&sts=2 Acesso em: 08 mai. 2024.

JI, P. F.; YAO, C. L.; WANG, Z. Y. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 563–570, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464809002678>. Acesso em 18 dez. 2023.

JONES, D. B. *et al.* A comparative integrated gene-based linkage and locus ordering by linkage disequilibrium map for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 7, n. 1, p.1-14, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-10515-7>. Acesso em 30 jan. 2023.

KANG, B. J. *et al.* Dynamics of Vitellogenin and Vitellogenesis-Inhibiting Hormone Levels in Adult and Subadult Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*: relation to molting and eyestalk ablation. **Biology Of Reproduction**, [S. l.], v. 90, n. 1, p. 1-10, 2014. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/90/1/12,%201-10/2514114>. Acesso em: 10 jan. 2023.

KLEIN, B. *et al.* Molecular Cloning and Sequencing of Trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in Assessing Gene Expression during the Moulting Cycle. **JORNAL Int. J. Bioquímica. Biol celular**, [S.l.], v. 28, p. 551-563, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8697100/>. Acesso em 25 jan. 2024.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 150, p. 5-20, 2015. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/aquicultura-no-brasil-principais-especies-areas-de-cultivo-racoes-fatores-limitantes-e-desafios/>. Acesso em: 12 jan. 2023.

İRKİN, L. C. Aquaculture and biotechnology. **Iksad publishing house**, Çanakkale, v.1, n.1, p. 51-61, 2021. Disponível em: <https://iksadyayinevi.com/wp->

content/uploads/2021/02/AQUACULTURE-and-BIOTECHNOLOGY.pdf. Acesso em: 09 mai. 2024.

LEITÃO, R. et al. Reúso da água da despesca na produção de camarão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 12, p. 1314-1320, 2011. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/915542/reuso-da-agua-da-despesca-na-producao-de-camarao#:~:text=Os%20resultados%20mostraram%20que%20o,pode%20aumentar%20a%20produtividade%20da>. Acesso em: 13 jan. 2023.

LEMOS, D.; EZQUERRA, J.; GARCIA-CARREÑO, F. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. **Aquaculture**, [S.l.], v. 186, n. 1-2, p. 89-105, jun. 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848699003713?via%3Dihub>. Acesso em 03 abr. 2024.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

LI, Y. et al. Identification of gonadal associated genes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using transcriptome analysis and high-throughput sequencing. **Aquaculture Research**, [S.l.], p. 1-11, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/are.16128>. Acesso em: 12 jan. 2023.

LIANG, Z.; YANG, L.; ZHENG, J.; ZUO, H.; WENG, S.; HE, J.; XU, X. A low-density lipoprotein receptor (LDLR) class A domain-containing C-type lectin from *Litopenaeus vannamei* plays opposite roles in antibacterial and antiviral responses. **Developmental and Comparative Immunology**, [S. l.], v. 92, p. 29-34, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0145305X18304270>. Acesso em 17 jun. 2024.

LIANG, X. et al. Effects and Mechanism of Different Phospholipid Diets on Ovary Development in Female Broodstock Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Frontiers In Nutrition**, [S.l.], v. 9, p. 1-19, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.830934/full>. Acesso em 27 jan. 2022.

LIM, C. et al. Growth response and fatty acid composition of juvenile *Penaeus vannamei* sources of dietary lipid. **Aquaculture**, [S. l.], v. 151, p. 143-153, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848696015001>. Acesso em: 27 out. 2023.

LIMA, A. P. S. **Estrutura genética de populações cultivadas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em Pernambuco**. 2007, 85 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

LIMA, J. et al. Técnicas de Ablação Unilateral como Indutor da Maturação Gonadal no Camarão-da-Amazônia (*Macrobrachium amazonicum*). Macapá: **Embrapa**, 2015. 4 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/139890/1/CPAF-AP-2015-COM-TEC-139-Tecnicas-de-ablacao.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2023.

- LIU, Y. *et al.* Effects of salinity training on growth performance, osmotic regulation, and pathogen resistance of post-larval *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, [S.l.], v. 562, p. 738-770, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848622008870?via%3Dihub>. Acesso em: 01 fev. 2023.
- LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, [S.l.], v. 25, p. 402-408, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/>. Acesso em: 12 out. 2022.
- LOPES, D. *et al.* Reproductive cycle of seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Crustacea, Penaeidea) from the northeast coast of Brazil. **Invertebrate Reproduction & Development**, [S.l.], v. 61, p. 1-5, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07924259.2017.1311951>. Acesso em: 13 jan. 2023.
- LUO, X. *et al.* Differential regulation of hepatopancreatic vitellogenin (VTG) gene expression by two putative molt-inhibiting hormones (MIH1/2) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Peptides**, [S.l.], v. 68, p. 58-63, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25447412/>. Acesso em 12 jan. 2023.
- MACHADO, I. F.; DUMONT, L. F. C.; D'INCAO, F. Stages of gonadal development and mean length at first maturity of wild females of white shrimp (*Litopenaeus schmitti* – Decapoda, Penaeidae) in southern Brazil. **Atlântica**, Rio Grande, v. 31, n. 2, p. 169-175, 2009. Disponível em: <http://www.repositorio.furg.br/bitstream/handle>. Acesso em: 24 jan. 2023.
- MAGGIONI, D. *et al.* Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 241, p. 501-515, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848603005301>. Acesso em: 15 mar. 2024.
- MANEII, K. *et al.* Reproductive performance and vitellogenin mRNA transcript abundance in the hepatopancreas of female *Litopenaeus vannamei* fed diets with different soy lecithin content. **Animal Reproduction Science**, [S.l.], v. 211, p.106-228, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432019307900?via%3Dihub>. Acesso em: 13 mai. 2022.
- MEDINA, A. *et al.* A comparative study of the ovarian development in wild and pond-reared shrimp, *Penaeus kerathurus* (Forsk., 1775). **Aquaculture**, [S.l.], v. 77, n. 1, p. 229-242, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848696014081>. Acesso em: 14 jan. 2023.

MELO, F. P. *et al.* Cultivo do camarão marinho com bioflocos sob diferentes níveis de proteína com e sem probiótico. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, p. 202-210, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcaat/a/gnHGMjBzZVJ789hdsd9DVDL/?lang=pt>. Acesso em: 14 jan. 2023.

MENEZES, Thiago Bastos Bezerra de. **Efeito da não ablação no processo de reprodução de fêmeas de *Penaeus vannamei***. 2019. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia de Pesca, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

MEUNPOL, O.; MEEJING, P.; PIYATIRATITIVORAKUL, S. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. **Aquaculture Research**, [S.l.], v. 36, n. 12, p. 1216-1225, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2109.2005.01342.x>. Acesso em 20 mai. 2024.

MONTALVO, G. *et al.* Immune gene expression and antioxidant response to vitamin E enriched diets for males *Litopenaeus vannamei* breeder (Boone, 1931). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [S.l.], v. 268, p. 111-187, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1095643322000459?via%3Dihub>. Acesso em: 05 jun. 2024.

NASER, M. N.; SARKER, M. N.; HOSAIN, M. E. Whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: current status, future prospects and opportunities for bangladesh aquaculture. **Bangladesh Journal Of Zoology**, [S.l.], v. 50, n. 2, p. 143-184, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3329/bjz.v50i2.62051>. Acesso em 16 ago. 2023.

NORÕES, A. K. M. **Eficiência produtiva da carcinicultura nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte**. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado em Economia Rural) - Economia Agrícola, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

NRC (National Research Council). **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, D.C.: The National Academies Press, 2011, p. 376.

PAIVA, N. H. **O papel da bifurcação das projeções da mucosa durante a morfogênese das vilosidades intestinais em embriões de galinhas**. 2017. 45 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2017.

PALACIOS, E.; IBARRA, A.M; RACOTTA, I. S. 2000. Tissue biochemical composition in relation to multiple spawning in wild and pond-reared *Penaeus vannamei* broodstock. **Aquaculture**, [S.l.], v. 185, p. 185, 353–371, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848699003622>. Acesso em: 26 jan. 2023.

PALACIOS, E.; RACOTTA, S. Spawning Frequency Analysis of Wild and Pond-Reared Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei* Broodstock under Large-Scale Hatchery Conditions. **Journal Of The World Aquaculture Society**, [S.l.], v. 30, n. 2, p. 180-191, 1999. Disponível

em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1749-7345.1999.tb00865.x>. Acesso em 18 mai. 2024.

PALACIOS, E. *et al.* Relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*, Boone, 1931). **Aquaculture International**, [S.l.], v. 9, n. 6, p. 531-543, 2002. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/226711540_Relation_between_lipid_and_fatty_acid_composition_of_eggs_and_larval_survival_in_white_pacific_shrimp_Penaeus_vannamei_Boone_1931. Acesso em 19 mai. 2024.

PALACIOS, E.; RODRÍGUEZ-JARAMILLO, C.; RACOTTA, I. Comparison of ovary histology between different-sized wild and pond-reared shrimp (*Penaeus vannamei*). **Invertebrate Reproduction & Development**, [S.l.], v. 35, n. 3, p. 251-259, 1999. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07924259.1999.9652391>. Acesso em 19 mai. 2024.

PANTALIÃO, Gabriel Feresin. **Estudo de associação genômica ampla para produtividade em arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2016. 152 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

PEIXOTO, S. *et al.* Reproductive cycle and size at first sexual maturity of the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) in northeastern Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Research**, [S.l.], v. 46, p. 1-9, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.cl/pdf/lajar/v46n1/0718-560X-lajar-46-01-0001.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2023.

PÉREZ-FARFANTE, I. Sinopsis de datos biológicos sobre el camarón blanco *Penaeus schmitti* Burkenroad. **Fish. Rep**, [S.l.], v.4, p.1417-1433, 1970. Disponível em: <http://www.fao.org/3/ap907e/ap907e.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2024.

PÉREZ-FARFANTE, I. Spermatophores and thelyca of the american white shrimp, genus *Penaeus*, subgenus *Litopenaeus*. **Fishery Bulletin**, [S.l.], v.73, p. 463-486, 1975. Disponível em: <https://spo.nmfs.noaa.gov/sites/default/files/pdf-content/fish-bull/perez%20%281%29.pdf>. Acesso em: 21 out. 2023.

PEREZ FARFANTE, I., KENSLEY, B. F. Penaeids and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World : Keys and Diagnoses for the Families and Genera. **Muséum national d'Histoire naturelle**, Paris, 233p, 1997. Disponível em: <https://sciencepress.mnhn.fr/en/collections/memoires-du-museum-national-d-histoire-naturelle/penaeids-and-sergestoid-shrimps-and-prawns-world>. Acesso em: 21 out. 2023.

PHIRIYANGKUL, P. *et al.* Dynamics of Vitellogenin mRNA Expression During Vitellogenesis in the Banana Shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis* Using Real-Time PCR. **Molecular Reproduction and Development**, [S.l.], v. 74, n. 9, p. 1198-1207, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17342737/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

PHIRIYANGKUL, P; UTARABHAND, P: Molecular characterization of a cDNA

encoding vitellogenin in the banana shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) merguensis* and sites of vitellogenin mRNA expression. **Molecular Reproduction And Development**, [S.l.], v. 73, n. 4, p. 410–423, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16432892/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

RACOTTA, I; PALACIOS, E.; IBARRA, A. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. **Aquaculture**, [S.l.], v. 227, n. 10, p. 107-130, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848603004988?via%3Dihub>. Acesso em 17 mai. 2024.

RAVIV, S. *et al.* Complete sequence of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: decapoda) vitellogenin cDNA and its expression in endocrinologically induced sub-adult females. **General And Comparative Endocrinology**, [S.l.], v. 145, n. 1, p. 39-50, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016648005001905>. Acesso em 19 ago. 2023.

ROCHA, Natalia dos Santos. **Maturação do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*: o modelo de produção da Aquacrusta LTDA (Acará-CE)**. 2007. 39 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

RODRIGUES, J.; BORBA, M. Carcinicultura Brasileira: Estatísticas e revelações. **Feed&food**, Sorocaba, v. 1, n. 1, p.40-40, 2013. Disponível em: https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2013/12/Carcinicultura-Brasileira_-Estat%C3%ADsticas-e-Revela%C3%A7%C3%B5es-ABRIL-2013.pdf. Acesso em: 11 jan. 2023.

RODRIGUES, M. *et al.* Histological and Histochemical Dynamism of Oogenesis in the Cinnamon River Prawn *Macrobrachium acanthurus* (Caridea: Palaemonidae) Induced by Eyestalk Ablation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S.l.], v. 4, n. 94, p. 1-17, 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/SDmKnYjmjQ4LjRK5vqqrWdb/?format=pdf&lang=en>. Acesso em 17 mai. 2024.

ROSA, A. N. Melhoramento genético aplicado em gado de corte. **Embrapa**, Brasília, v. 1, p. 11-27, 2013. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/127707/1/Melhoramento-Genetico-livro-completo.pdf>. Acesso em 12 jan. 2024.

ROTLLANT, G. *et al.* Identification of genes involved in reproduction and lipid pathway metabolism in wild and domesticated shrimps. **Marine Genomics**, [S.l.], v. 22, p. 55-61, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25890100/>. Acesso em: 09 nov. 2022.

RÖSZER, T. The invertebrate midintestinal gland (“hepatopancreas”) is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. **Cell And Tissue Research**, [S.l.], v. 358, n. 3, p. 685-695, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-014-1985-7>. Acesso em 04 abr. 2024.

SANTANA, I.; SILVA, T. T.; MULDER, A. P. Coqueiro (*Cocos nucifera l.*) e produtos alimentícios derivados: uma revisão sobre aspectos de produção, tecnológicos e nutricionais. **Tecnologia de Alimentos: Tópicos Físicos, Químicos e Biológicos**, [S.l.], v. 2, p. 80-101,

2020. Disponível em: <https://www.editoracientifica.com.br/books/livro-tecnologia-de-alimentos-topicos-fisicos-quimicos-e-biologicos-volume-2>. Acesso em: 19 jul. 2022.

SENAR. **Larvicultura de camarão marinho: do náuplio a pós-larva**. Brasília, 2016. 108 p.

SIEBERT, T. H. R. **Dinâmica e imuno-histoquímica da vitelogênese durante o processo de maturação ovariana no camarão *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862)**. 2015. 99 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Programa de Pós graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

SILVA, E. F *et al.* Reproductive dynamics of the southern pink shrimp *Farfantepenaeus subtilis* in northeastern Brazil. **Aquatic Biology**, [S.l.], v. 25, p. 29-35, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/300374623_Reproductive_dynamics_of_the_southern_pink_shrimp_Farfantepenaeus_subtilis_in_northeastern_Brazil. Acesso em: 23 jan. 2023.

SILVEIRA, A. S. *et al.* An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, [S.l.], v. 79. P. 44-50, 2018. Disponível em: <https://hal.science/hal-01632381/document>. Acesso em 22 jan. 2023.

SIMÓ-MIRABET, P. *et al.* Sal de sódio, ácidos graxos de cadeia média e estratégias probióticas à base de *Bacillus* para melhorar o crescimento e a saúde intestinal da dourada (*Sparus aurata*). **PeerJ**, [S.l.], v.5. p. 4001, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29226031/>. Acesso em: 05 jun. 2024.

SOUSA, Míriam Luzia Nogueira Martins de. **Efeitos de indutores na maturação ovariana de fêmeas do camarão *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862)**. 2017. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2017.

SOUSA, Rafael Damiane Santos. **Estudo de substâncias químicas em óleos de coco, copaíba, calêndula e girassol utilizados no tratamento de feridas: uma abordagem teórica**. 2018. 50f. Monografia (Graduação em Química Industrial) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologias, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

SU, X. *et al.* The improvement of growth, digestive enzyme activity and disease resistance of white shrimp by the dietary citric acid. **Aquaculture international**, [S.l.], v. 22, p. 1823-1835, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-014-9785-3>. Acesso em: 08 jun. 2024.

SUN, C. *et al.* Response of *Macrobrachium rosenbergii* to Vegetable Oils Replacing Dietary Fish Oil: Insights From Antioxidant Defense. **Frontiers in Physiology**, Itália, v. 11, n. 218, p. 1-12, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.00218/full>. Acesso em: 16 abr. 2022.

TSENG, D-Y. *et al.* Hepatopancreas and ovary are sites of vitellogenin synthesis as determined from partial cDNA encoding of vitellogenin in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. **Invertebrate Reproduction & Development**, [S.l.], v. 42, n. 2-3, p. 137-143, dez. 2002. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/254244679_Hepatopancreas_and_ovary_are_sites_

of_vitellogenin_synthesis_as_determined_from_partial_cDNA_encoding_of_vitellogenin_in_the_marine_shrimp_Penaeus_vannamei. Acesso em: 22 mar. 2024.

VALENTIM-NETO, P.; MOSER, J.; FRAGA, A. Hsp70 expression in shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to IHHNV and WSSV infection. **Virus disease**, [S.l.], v. 25, n. 4, p. 437-440, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4262311/>. Acesso em: 31 mar. 2024.

VALLES-JIMENEZ, R.; CRUZ, P.; PEREZ-ENRIQUEZ, R. Population Genetic Structure of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panamá: Microsatellite DNA Variation. **Marine Biotechnology**, [S.l.], v. 6, p. 475-484, 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10126-004-3138-6>. Acesso em: 19 jan. 2023.

VELASCO-ESCUADERO, M.; LAWRENCE, A. L. Nutrient requirements and current status of shrimp nutrition research. In: ALDAY-SANZ, V. **The Shrimp Book**. United Kingdom: Nottingham University Press. 2010. p. 477-481.

VENTURA-LÓPEZ, C. *et al.* Transcriptomic information from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) ovary and eyestalk, and expression patterns for genes putatively involved in the reproductive process. **General And Comparative Endocrinology**, [S.l.], v. 246, p. 164-182, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27964922/>. Acesso em: 29 jan. 2023.

VIDAL, Maria de Fátima. **Carcinicultura**. Caderno Setorial Etene, Fortaleza, v. 222, n. 7, p. 1-10, abr. 2022.

WANG, Y. C.; CHANG, P. S.; CHEN, H. Y. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 1161-1177, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464807000873>. Acesso em 27 set. 2023.

WANG, W. *et al.* Investigation of Gene Sequence Divergence, Expression Dynamics, and Endocrine Regulation of the Vitellogenin Gene Family in the Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Frontiers In Endocrinology**, [S.l.], v. 11, p. 1-15, 19 nov. 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2020.577745/full>. Acesso em: 02 mar. 2024.

WANG, W. *et al.* An Evaluation of Replacing Soybean Meal with Proteolytic Soybean Meal in Low-Fish-Meal Diet on Growth Performance, Expression of Immune-Related Genes, and Resistance against *Vibrio alginolyticus* in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Nutrition**, [S.l.], v. 22, p. 1-9, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36860454/>. Acesso em: 04 abr. 2023.

WONGPOOWARAK, W. *et al.* Model of Degradation Kinetics for Coconut Oil at Various Heating Temperatures. **Silpakorn University Science and Technology Journal**, [S.l.], v. 2, n. 2, p. 43-49, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576914000800?via%3Dihub>. Acesso em: 12 ago. 2022.

WOUTERS, R. *et al.* Ovarian maturation and haemolymphatic vitellogenin concentration of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed increasing levels of total dietary lipids and HUFA. **Aquaculture Research**, [S.l.], v. 32, p. 573-582, 2001. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2109.2001.00580.x>. Acesso em: 24 jan. 2023. 2001a

WOUTERS, R. *et al.* Penaeid shrimp broodstock nutrition: na updated review on research and development. **Aquaculture**, [S.l.], v. 202, p. 1-21, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848601005701>. Acesso em: 24 jan. 2023. 2001b

WOUTERS, R. *et al.* Experimental broodstock diets as partial fresh food substitutes in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, [S.l.], v. 8, p. 249–256, 2002. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2095.2002.00213.x>. Acesso em 12 jan. 2023.

WU, R. *et al.* Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (HSC70) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* *Litopenaeus vannamei*. **Jornal Mol. Biol**, [S.l.], v. 42, p. 234-242, 2008. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S002689330802009X>. Acesso em 19 out. 2023.

XU, X. *et al.* Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. **Aquaculture**, [S.l.], v. 119, n. 4, p. 359-370, 1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004484869490300X>. Acesso em 13 jun. 2023.

YANG, D. *et al.* Gonadal maturation in *Litopenaeus vannamei* fed on four different polychaetes. **Aquaculture Reports**, [S.l.], v. 22, p. 100920, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513421003367>. Acesso em 27 mai. 2024.

YANG, L. *et al.* Effects of Dietary Supplementation of Lauric Acid on Lactation Function, Mammary Gland Development, and Serum Lipid Metabolites in Lactating Mice. **Animals**, [S.l.], v. 10, p. 529, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/3/529>. Acesso em: 16 jun. 2024.

YANO, I. *et al.* Mating behaviour in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. **Marine Biology**, [S.l.], v. 97, p. 171-175, 1988. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/226118848_Mating_behavior_on_the_penaeid_shrimp_Penaeus_vannamei. Acesso em 10 abr. 2024.

ZACARIAS, S. *et al.* Reproductive performance and offspring quality of non-ablated Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under intensive commercial scale conditions. **Aquaculture**, [S.l.], v. 503, p. 460-466, 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848618312547>. Acesso em 12 fev. 2024.

ZANITTI, M. *et al.* Long-term exposure of the red cherry shrimp *Neocaridina davidi* to diclofenac: impact on survival, growth, and reproductive potential. **Research Square**, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 1-19, 2022. Disponível em: <https://assets-eu.researchsquare.com/files/rs-2330463/v1/4658643d-50ad-4175-84ff-778673e7190d.pdf?c=1672246814>. Acesso em 20 mai. 2024.

ZHANG, J. *et al.* Modulation of Morphological and Several Physiological Parameters in Sedum under Waterlogging and Subsequent Drainage. **Russian Journal Of Plant Physiology**, [S.l.], v. 66, n. 2, p. 290-298, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S1021443719020183>. Acesso em: 01 abr. 2024.

ZHANG, H. *et al.* The effects of different lipid sources on the growth, intestinal health, and lipid metabolism of the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, [S.l.], v. 548, p. 1-11, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848621013181?via%3Dihub>. Acesso em: 12 dez. 2023.

ZHAO, Z. *et al.* Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation. **Jornal Peixe Marisco Immunol.**, [S.l.], v. 22, p. 520-534, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464806001240>. Acesso em 12 jan. 2024.

ZHENYU, G.; CHUANZHEN, J.; JIANHAI, X. Heat-shock protein 70 expression in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* during thermal and immune-challenged stress. **Chinese Journal Of Oceanology And Limnology**, [S.l.], v. 22, n. 4, p. 386-391, 2004. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02843633>. Acesso em: 30 mar. 2024.

ZHU, W. *et al.* Effects of dietary n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) composition on growth performances and non-specific immunity in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Reports**, [S.l.], v. 28, p. 101436, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S235251342200432X?via%3Dihub>. Acesso em 13 jun. 2024.