

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

NÍVEIS DE CÁLCIO, FÓSFORO, LIPÍDEO E PROTEÍNA NA DIETA  
INERTE DO CAMARÃO-DA-MALÁSIA *Macrobrachium rosenbergii*,  
NA FASE LARVAL

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado  
Zootecnista

JABOTICABAL  
São Paulo, Brasil  
Fevereiro de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

NÍVEIS DE CÁLCIO, FÓSFORO, LIPÍDEO E PROTEÍNA NA DIETA  
INERTE DO CAMARÃO-DA-MALÁSIA *Macrobrachium rosenbergii*,  
NA FASE LARVAL

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado  
Zootecnista, Esp., MSc.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Cotroni Valenti

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura do CAUNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Aqüicultura (Área de Concentração: Aqüicultura em Águas Continentais).

JABOTICABAL  
São Paulo, Brasil  
Fevereiro de 2009

Guerrero Alvarado, Camilo Ernesto  
G934n Níveis de cálcio, fósforo, lipídeo e proteína na dieta inerte do camarão-da-malásia *Macrobrachium rosenbergii*, na fase larval/  
Camilo Ernesto Guerrero Alvarado. – – Jaboticabal, 2009  
x, 100 f.; 28 cm

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura (CAUNESP), 2009

Orientador: Wagner Cotroni Valenti

Banca examinadora: Helenice Pereira de Barros, José Eurico Possebon Cyrino, Gilberto Moraes, Wilson Massamitu Furuya

Bibliografia

1. Nutrição de crustáceos. 2. Exigências nutricionais. 3. Larvicultura. 4. Camarão de água doce. I. Título. II. Jaboticabal - Centro de Aquicultura.

CDU 639.512


Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** NÍVEIS DE CÁLCIO, FÓSFORO, LIPÍDEO E PROTEÍNA NA DIETA INERTE DO CAMARÃO-DA-MALÁSIA, Macrobrachium rosenbergii, NA FASE LARVAL.

**AUTOR:** CAMILO ERNESTO GUERRERO ALVARADO  
**ORIENTADOR:** Prof. Dr. WAGNER COTRONI VALENTI

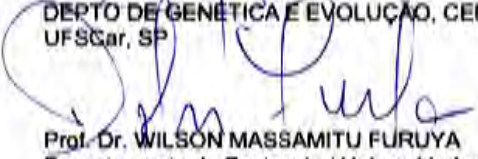
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. WAGNER COTRONI VALENTI  
Departamento de Biol Aplicada A Agrop / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dra. HELENICE PEREIRA DE BARROS  
INSTITUTO DE PESCA DE SÃO PAULO

  
Prof. Dr. JOSÉ EURICO POSSEBON CYRINO  
Departamento de Zootecnia / Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Usp

  
Prof. Dr. GILBERTO MORAES  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE, UFSCar, SP

  
Prof. Dr. WILSON MASSAMITU FURUYA  
Departamento de Zootecnia / Universidade Estadual de Maringá

Data da realização: 19 de fevereiro de 2009.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**CAMILO ERNESTO GUERRERO ALVARADO** - nascido em 02 de maio de 1974, em Bogotá D.C., Colômbia, é Zootecnista formado pela Universidad Nacional de Colombia – Câmpus de Bogotá D.C., em 13 de abril de 2000. Obteve o grau de Especialista em Aqüicultura “Águas Continentais” pelo Instituto de Acuicultura de los Llanos da Universidad de los Llanos, Villavicencio – Meta, Colômbia, em 31 de agosto de 2001. Recebeu o Título de Mestre em Aqüicultura na Área de Aqüicultura em Águas Continentais pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” obtido junto ao Centro de Aqüicultura (CAUNESP), Jaboticabal - São Paulo, Brasil, em 21 de julho de 2003, sendo bolsista da Organização dos Estados Americanos (OEA) processo n° 9488. Foi professor do curso de Tecnologia em Aqüicultura da Universidad del Pacifico – Buenaventura - Valle del Cauca, Colômbia, desde novembro de 2003 até fevereiro de 2005. Finalmente lhe foi conferido o Título de Doutor em Aqüicultura pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” obtido junto ao Centro de Aqüicultura (CAUNESP) em Jaboticabal, SP – Brasil, em 19 de fevereiro de 2009. Sendo bolsista do Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG-CAPES) processo n° 0078042.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Yezmin e Alfonso, à minha irmã Karol Andrea e à minha avó Concepción que com tanto amor e paciência, suportaram a minha ausência longe da Colômbia.*

*Com muito orgulho, dedico.*

*À minha namorada Gísele pelo amor, companhia e apoio incondicional.*

*Com todo meu amor, ofereço.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Wagner Cotroni Valenti pela disposição constante, apoio, dedicação, confiança e incentivos concedidos e principalmente, pela sua excelente orientação, sempre enfocada no ensino da metodologia científica e da filosofia da ciência, que aperfeiçoaram meu desempenho como pesquisador e docente universitário;

Ao setor de Carcinicultura do CAUNESP pelo suporte técnico para a realização de todos os experimentos.

Ao Programa de Estudantes Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG-CAPES), entidade responsável pela concessão da bolsa, recurso fundamental de apoio econômico durante a realização do doutorado.

À Dra. Alessandra da Silva Augusto e ao Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, membros da banca examinadora da qualificação pelas correções e sugestões, que permitiram o aprimoramento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora da defesa de doutorado: Dra. Helenice Pereira de Barros, Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino, Prof. Dr. Gilberto Moraes e Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya pelas excelentes contribuições proporcionadas na melhora desta tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista “*Júlio de Mesquita Filho*”, pela chance de me proporcionar enriquecimento acadêmico e intelectual.

À diretoria, coordenação, funcionários e professores do CAUNESP pelos sete anos de convívio.

À minha namorada, pelo seu amor, carinho, companheirismo e paciência em me agüentar.

Às minhas amigas Dra. Michelle Pinheiro Vetorelli e MSc. Janaina Kimpara, pela ajuda na realização das análises estatísticas do trabalho e pela amizade e convívio durante o doutorado.

Aos funcionários do Laboratório de Análises de Alimentos (LANA) do Departamento de Zootecnia – FCAV – Jaboticabal, pela colaboração na realização das análises bromatológicas.

Aos técnicos, estagiários, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos do Setor de Carcinicultura do CAUNESP, pela colaboração na execução dos experimentos e,

sobretudo nas intermináveis contagens de larvas: Michelle, Michélinha, Adriana, Ana, Janaina, Juliana (Jujubinha), Daniela, Fernanda, Joseane, Priscila, Graziela, Fabrício, Zé Mário, Bruno, Bruninho, Matheus, Alexandre, Marcelo, Alan, Ariel, Arnaldo, Breno, Eduardo (Kotoko), John (Bahia), Newton, Tibério, Mauricio e Roberto Polachini, técnico do setor.

Aos funcionários do CAUNESP, pela amizade e profissionalismo: Dona Ana “*in memoriam*”, Veralice, Daniel, Silvinha, Elisandra, Fátima, Mônica, Juliana, Camila, Sueli, Valdecir, Donizetti, Sr. Mauro, Márcio (Perereca), Márcio (tilapicultura) e a todos os demais.

Aos Colombianos do CAUNESP pelo convívio: Camilo Alberto, John, Julian, Leonardo e Wilson.

Aos Colombianos de Jaboticabal, pela amizade e apoio: Andrey, Carlos Alfredo e família (Victoria, Sofia e Felipe), Giovanni, Javier, Jesus, Nidia e filhos (Pablo Emilio e Alejandro), Juan Pablo, Verónica, Juana, Miguel e Henry. Obrigado por compartilhar comigo momentos alegres longe da nossa linda e inesquecível Colômbia.

Aos meus sogros Doralice e Tarciso e aos meus cunhados Carol e Juninho, pelos gratos momentos vividos em Ribeirão Preto. Sem vossa presença este tempo fora da minha terra não teria sido tão formidável. Obrigado pelo seu carinho e hospitalidade.

À minha amiga Luiza F. Trevizan, pela amizade e valiosa colaboração.

À minha família, pelo carinho, compreensão e paciência por estar afastado do meu lar.

À Universidad del Pacifico – Programa de Tecnología en Acuicultura - Buenaventura, Valle del Cauca, Colombia, onde trabalhe como docente, pelo incentivo para realizar meu doutorado fora do país.

Àqueles que, embora não citados, estiveram presentes, ou de forma casual, ou esporadicamente, muito obrigado.

Finalmente ao povo Brasileiro, pela fantástica cordialidade e alegria, vocês são pessoas maravilhosas e hospitaleiras. Sempre estarei grato porque conseguiram que nestes quatro anos longe da minha da minha terra, passem somente com um pequeno instante no tempo cósmico. Vocês podem acreditar, me senti como na minha casa.

*Y descubrí para mi júbilo  
que es la vida y no la muerte  
la que no tiene fronteras*

*"El Amor en los Tiempos del Cólera"*

*Gabriel García Márquez*

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPITULO 1. INTRODUCAO GERAL.....</b>	1
Referências.....	16
<b>CAPITULO 2. NÍVEIS DIETÉTICOS DE CÁLCIO E FÓSFORO NA FASE LARVAL DE <i>Macrobrachium rosenbergii</i>.....</b>	24
Resumo.....	25
Abstract.....	26
Resumen e Résumé.....	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	29
Resultados.....	37
Discussão.....	42
Agradecimentos.....	45
Referências.....	45
<b>CAPITULO 3. NÍVEIS DIETÉTICOS DE LIPÍDEO PARA A LARVICULTURA DE <i>Macrobrachium rosenbergii</i>.....</b>	47
Resumo.....	48
Abstract.....	49
Resumen e Résumé.....	50
Introdução.....	51
Material e Métodos.....	52
Resultados.....	60
Discussão.....	63
Agradecimentos.....	67
Referências.....	67
<b>CAPITULO 4. NÍVEIS DIETÉTICOS DE PROTEÍNA PARA A LARVICULTURA DE <i>Macrobrachium rosenbergii</i>.....</b>	70
Resumo.....	71
Abstract.....	72
Resumen e Résumé.....	73
Introdução.....	74
Material e Métodos.....	75
Resultados.....	84
Discussão.....	88
Agradecimentos.....	91
Referências.....	92
<b>CAPITULO 5. CONSIDERACOES FINAIS.....</b>	95

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO GERAL



FONTE DAS FOTOS: TAKUJI FUJIMURA

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A aqüicultura é definida como a produção de organismos aquáticos em áreas continentais ou costeiras, que implica por um lado a intervenção no processo de criação para melhorar a produção e por outro lado a propriedade individual ou empresarial do stock produzido (FAO, 2008). A criação de organismos aquáticos em condições controladas pelo homem é uma atividade que se iniciou há muito tempo. No entanto, surpreende o lento desenvolvimento histórico da aqüicultura, quando comparada com outras atividades produtivas, como a pecuária ou agricultura. Talvez para isso tenha contribuído a relativa facilidade de captura de uma das fontes de alimento que parecia inesgotável, o pescado. Na atualidade, a situação mudou, não somente pela evidente crise dos recursos pesqueiros, mas porque nas três últimas décadas foram desenvolvidos sistemas zootécnicos específicos que facilitaram e impulsionaram o desenvolvimento da carnicultura e da piscicultura chegando a convertê-las em indústrias de produção animal.

A aqüicultura mundial contribuiu com mais de 51,65 milhões de toneladas no ano de 2006, equivalente a U\$ 78,76 bilhões (FAO, 2009). A produção total de crustáceos em 1996 passou de 1,11 milhões de toneladas (U\$ 7,09 bilhões) para 4,50 milhões de toneladas (U\$ 17,95 bilhões) em 2006, o equivalente a 405,4% de aumento. Na produção mundial de crustáceos em 2006, houve predomínio absoluto dos camarões marinhos, com 70,37% do total produzido (3,16 milhões de toneladas). Em escala bem menor estiveram os crustáceos de água doce (principalmente lagostim e camarões), representando 23,70% (1,07 milhões de toneladas), em seguida os caranguejos com 5,0% (224,8 mil toneladas) e outros grupos (diversos crustáceos marinhos e lagostas), totalizando 0,93% (41,8 mil toneladas) da produção total (FAO, 2009).

A criação de camarões de água doce é um dos setores da aqüicultura que mais cresceram nos últimos anos em âmbito mundial (Mallasen e Valenti, 2008). O gênero *Macrorachium* apresenta considerável importância econômica, sendo bastante utilizado na dieta humana (Valenti, 1993). Existem aproximadamente 210 espécies reconhecidas (Short, 2004), deste gênero, distribuídas tanto em zonas tropicais quanto subtropicais.

Entre 2003 e 2006, a produção mundial dos principais camarões comercializados deste gênero *M. nipponense*, *M. rosenbergii* e *M. malcolmsonii* teve aumento de 112,3% (FAO, 2009). Em 2006, a produção total mundial de *M. rosenbergii* alcançou 201,46 mil toneladas. Neste mesmo ano, considerando as duas principais espécies produzidas, *M. nipponense* (50,4%) e *M. rosenbergii* (48,6%), o volume

produzido superou 410.000 toneladas, movimentando mais de US\$ 1,63 bilhões. Os principais produtores de *M. rosenbergii* em 2006, em quantidade foram: China, Índia, Tailândia, Bangladesh, Taiwan, Indonésia e Brasil. Desde 2000 o único produtor de *M. nipponense* é a China. No Brasil,

Das espécies acima mencionadas, a única criada comercialmente no Brasil é o *M. rosenbergii*, sendo que entre 2000 e 2006 sua produção oscilou ao redor de 415 toneladas anuais (FAO, 2009). Segundo dados da FAO (2009) e do IBAMA (2008), em 2006, a produção de *M. rosenbergii* no Brasil foi de 373 toneladas, movimentando R\$ 3.039.500,00. Neste mesmo ano, os principais estados brasileiros produtores desta espécie foram: Espírito Santo (76,4%), Pernambuco (15,3%), Rio de Janeiro (5,6%) e Sergipe (2,7%) (IBAMA, 2008).

O *M. rosenbergii* é originário do sul e sudeste asiático, parte da Oceania e algumas ilhas do Oceano Pacífico (New, 2002) e conhecido no Brasil como camarão-da-malásia, gigante-da-malásia, lagostim, camarão-azul ou camarão-de-água-doce. É um dos mais importantes representantes dos crustáceos decápodes em termos econômicos e espécie com grande potencial para a aquicultura de água doce (D'Abramo e Sheen, 1994; Dandapat et al., 2003), principalmente porque a tecnologia para sua criação já é amplamente conhecida. Esta espécie apresenta características biológicas que favorecem sua criação devido à alta fecundidade, rápido crescimento, tolerância a diferentes faixas de salinidade e temperatura, e resistência a doenças (New, 1995; Roustaian et al, 2001; Gupta, 2007), assim como alto valor comercial pela qualidade nutricional e sabor de sua carne.

Algumas características são básicas para que uma espécie de camarão de água doce possa ser produzida: fácil manutenção e reprodução em confinamento, rápido crescimento, manejo alimentar simples, rusticidade e boa aceitação no mercado consumidor (Mallasen e Valenti, 2008). Além disso, sua produção pode ser realizada em propriedades de pequeno, médio ou grande porte, localizadas próximas ao litoral ou no interior (Valenti, 1996). No momento, o *M. rosenbergii* é a espécie mais utilizada nos sistemas de produção, porque sua criação está bem desenvolvida (Mallasen e Valenti, 2008). A carcinicultura de água doce possibilita a produção integrada com a criação de tilápias em policultivo, ou com as plantações de arroz inundado, em consórcio, colocando o Brasil numa posição privilegiada para o desenvolvimento desta atividade (Valenti, 2005).

Apesar do crescimento da carcinicultura em alguns países do mundo, entre eles o Brasil, uma dificuldade encontrada tem sido o alto custo da alimentação nos estágios larvais. Devido ao alto preço dos náuplios de *Artemia*, seria importante estabelecer um melhor nível de eficiência alimentar em relação à taxa de crescimento na criação de organismos aquáticos (Sevilla e Gunther, 2000).

Os náuplios de *Artemia* têm sido os organismos vivos mais utilizados na criação de larvas de crustáceos e peixes e são excelentes para a primeira alimentação de larvas de espécies marinhas e de água doce (Hung et al., 1999; Naegel, 1999) devido à disponibilidade dos cistos (Støttrup e Norsker, 1997), os quais são facilmente comercializados no mercado internacional (Jomori, 2005). No entanto, o alto custo destes cistos é um sério inconveniente (Watanabe et al., 1983; Kerdechuen e Legendre, 1994; Hart e Purser, 1996; Lavens e Sorgeloos, 1998; Baskerville-Bridges e Kling, 2000; Sevilla e Günther, 2000; Cahu e Zambonino-Infante, 2001; Hung et al., 2002), tornando-se necessário investigar fontes alternativas de alimentos vivos ou inertes com valores nutricionais semelhantes aos dos náuplios de *Artemia* e com preços mais acessíveis (Silva e Rodrigues, 1997).

De fato, gastos com mão-de-obra e organismos vivos (náuplios de *Artemia*) são os itens mais onerosos na larvicultura de peixes (Salles, 1998; Guerrero-Alvarado, 2003; Jomori et al., 2005). Estudos econômicos em mostraram que os gastos com dos custos de produção A utilização de dietas artificiais substituindo os organismos vivos é decisiva para a diminuição dos custos, favorecendo a produção de larvas e juvenis em larga escala (Watanabe e Kiron, 1994; Cahu e Zambonino-Infante, 2001). O custo operacional efetivo dos náuplios da *Artemia* na larvicultura do camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) varia entre 10 e 17%, dependendo da cotação do dólar (Vetorelli, 2008).

### **1.1 Comportamento alimentar**

Larvas de *M. rosenbergii* apresentam metabolismo intenso e trato digestório curto e devem alimentar-se continuamente para sobreviver. Nesta fase, nadam livremente, capturando o alimento que está ao seu alcance, como por exemplo, zooplâncton, ração ou partículas de matéria orgânica em decomposição (Rodrigues e Zimmermann, 2004).

Segundo Barros e Valenti (1997), no estágio I de desenvolvimento larval de *M. rosenbergii* não ocorre ingestão de alimento. Em algumas larviculturas comerciais tem-se observado o fato da larva se alimentar pouco entre os estágios II e III de

desenvolvimento, presumivelmente devido à existência de reservas nutritivas provenientes do ovo e estocadas no hepatopâncreas, as quais são suficientes para suprir parte das necessidades da larva durante este curto período (Abrunhosa e Melo, 2002). No comportamento alimentar das larvas de *M. rosenbergii* observa-se o mesmo padrão geral a partir do estágio II de desenvolvimento, caracterizado por captura, apreensão, manipulação, ingestão ou rejeição do alimento, indicando que este processo não sofre variações ontogenéticas nesta fase (Barros e Valenti, 1997). A morfologia do estômago nos primeiros estágios larvais indica que a larva é então capaz de alimentar-se de finas partículas ou alimentos moles, como náuplios de *Artemia* e microalgas nestes estágios (Abrunhosa e Melo, 2002).

De acordo com <sup>1</sup>Moller (1978), citado por Alam et al. (1993), as larvas do *M. rosenbergii* são consumidoras passivas e por isso, necessitam de mais partículas alimentares a seu redor para obter alta taxa de encontro e facilitar a captura do alimento. As larvas de *Macrobrachium* utilizam os maxilípedes e pereiópodos tanto para locomoção quanto para a captura do alimento. Segundo Barros e Valenti (1997), este padrão parece ser comum às larvas planctônicas de crustáceos. Assim, em contato com os maxilípedes e peças bucais, tanto estímulos mecânicos como químicos podem ter papel importante para a ingestão do alimento. Segundo estes mesmos autores, a seletividade pelo alimento vivo diminui durante o processo de desenvolvimento e as larvas vão se tornando onívoras em maior grau, aumentando a capacidade de explorar os recursos alimentares disponíveis no ambiente.

Este fato pode ser explicado pelo aumento no grau de especialização do estômago, que nos últimos estágios larvais apresenta incremento de cerdas na válvula cárdio-pilórica e “*filter press*”, indicando que já não tem função trituradora, mas misturadora, durante as últimas fases do desenvolvimento larval (Abrunhosa e Melo, 2002). Estes mesmos autores afirmaram que as características do estômago da larva no último estágio mostram que esta pode variar a dieta, na procura de maior concentração de nutrientes, e assim facilitar a metamorfose para pós-larva (PL).

Kovalenko et al. (2002) avaliaram o desempenho em termos de sobrevivência e índice de estágio larval (IEL) em larvas de *M. rosenbergii* alimentadas, a partir do estágio V, somente com náuplios de *Artemia* ou com dieta microencapsulada, e não encontraram diferenças estatísticas significativas. No entanto, Ohs et al. (1998)

---

<sup>1</sup>Moller, T.H., 1978. Feeding behavior of larvae and post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 35: 251-258.

verificaram que quando as larvas de *M. rosenbergii* eram alimentadas exclusivamente com dieta “*spray-dried*”, a sobrevivência e o crescimento eram menores quando comparadas com larvas alimentadas somente com náuplios de *Artemia*. O baixo desempenho das larvas alimentadas com “*spray-dried*” provavelmente foi devido à variação na capacidade digestiva, que foi insuficiente para o processo de compactação das partículas do alimento ou simplesmente que alguns dos nutrientes da dieta provavelmente não ficaram disponíveis em quantidade e qualidade suficientes.

Barros e Valenti (2003<sup>a</sup>) observaram que os náuplios de *Artemia*, não são presas adequadas para as larvas de *M. rosenbergii* nos estágios IX, X e XI, sendo necessária a suplementação com dieta inerte e Barros e Valenti (2003<sup>b</sup>) verificaram que a dieta úmida foi ingerida por mais de 50% das larvas somente a partir do estágio VII, ou seja, as larvas poderiam ser alimentadas apenas com náuplios de *Artemia* até o estágio VI, oferecendo-se dieta úmida do estágio VII em diante e com partículas variando entre 250 a 1.190 µm. Sendo assim, a substituição gradual e eficiente da *Artemia*, pela dieta artificial (pudim de ovo), na alimentação das larvas de *M. rosenbergii*, a partir do estágio VII, possibilita melhora da eficiência da larvicultura e principalmente diminuição dos custos operacionais.

Náuplios de *Artemia* recém eclodidos são ricos em aminoácidos (Garcia-Ortega et al., 1998) e ácidos graxos essenciais (Garcia-Ortega et al., 1998; Roustaian, et al., 1999), mas não suprem todas as exigências nutricionais das larvas (Daniels et al., 1992). Desta forma, o uso de dietas suplementares adequadamente balanceadas poderá complementar as deficiências em nutrientes dos náuplios de *Artemia*. Já foram desenvolvidas dietas microparticuladas e microencapsuladas que melhoraram a nutrição de larvas de crustáceos (Jones, et al., 1987<sup>a</sup>; Koshio, et al., 1989; D’Abramo, 1998; Lavens, et al., 2000; Kovalenko et al., 2002) substituindo o alimento vivo (Langdon et al., 1985). No entanto, estas dietas não atingem as exigências nutricionais específicas em lipídios ou proteína das espécies estudadas.

## **1.2 Nutrição do gênero *Macrobrachium* e outros crustáceos**

A ciência da nutrição integra conhecimentos bioquímicos e fisiológicos relacionando o organismo animal com o suprimento alimentar de suas células. Entre 2002 e 2004, além da genética, as maiores áreas de publicação em pesquisas sobre o gênero *Macrobrachium* foram a nutrição e a alimentação (New, 2005). No caso dos camarões marinhos, o *Penaeus japonicus* tem sido estudado mais que as outras espécies

em termos de exigências nutricionais. Holme et al., 2009 fizeram uma revisão sobre níveis dietéticos de proteína e lipídeo para juvenis de crustáceos (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis dietéticos protéicos e lipídicos usados na formulação de dietas para juvenis de crustáceos

Espécies	Proteína Dietética	Referencia
<i>Penaeus monodon</i>	46%	Lee (1971)
<i>P. monodon</i>	35-40%	Lin et al. (1982)
<i>P. monodon</i>	40%	Alava e Lim (1983)
<i>P. monodon</i>	40-50%	Bautista (1986)
<i>P. monodon</i>	40-44%	Shiau et al. (1991)
<i>P. monodon</i>	36-40%	Shiau e Chou (1991)
<i>P. monodon</i>	42,9%	Merican e Shim (1996)
<i>P. setiferus</i>	50%	Brito et al. (2000)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	47,9-50,7%	Briggs et al. (1988)
<i>Homarus americanus</i>	50%	Conklin et al. (1980)
<i>H. americanus</i>	50%	Kean et al. (1985)
<i>Panulirus ornatus</i>	30-55%	Smith et al. (2003)
<i>Cherax quadricarinatus</i>	50%	Thompson et al. (2003)
<i>Eriocheir sinensis</i>	39-42,5%	Mu et al. (1988)
<i>Scylla serrata</i>	50%	Sheen e Wu (1999)
<i>S. serrata</i>	50%	Sheen (2000)
<i>S. serrata</i>	34,2-51,8%	Catacutan (2002)
	Lipídeo Dietético	Referencia
<i>Penaeus monodon</i>	7,4%	Merican e Shim (1996)
<i>P. indicus</i>	9-12%	Shivaram e Raj (1997)
<i>P. vannamei</i>	8,78-9,99%	Gong et al. (2000 <sup>a</sup> )
<i>P. vannamei</i>	7,88%	Gong et al. (2000 <sup>b</sup> )
<i>P. vannamei</i>	8,6%	Pascuala et al. (2002)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	8,46-11,95%	Briggs et al. (1988)
<i>M. rosenbergii</i>	2-10%	Sheen e D'Abramo (1991)
<i>Homarus americanus</i>	6%	Conklin et al. (1980)
<i>H. americanus</i>	10-17%	Kean et al. (1985)
<i>Cherax quadricarinatus</i>	6%	Thompson et al. (2003)
<i>Scylla serrata</i>	1,7-13,8%	Sheen e Wu (1999)
<i>S. serrata</i>	8-9,5%	Sheen (2000)
<i>S. serrata</i>	6 e 12%	Catacutan (2002)

Adaptado de Holme et al. (2009)

Na última década, entretanto a maioria das pesquisas têm sido desenvolvidas com o *Penaeus monodon* (Shiau, 1998) e o *Litopenaeus vannamei* (Shiau, 1998; Cuzon et al., 2004). No final do século passado, começaram-se desenvolver estudos nutricionais com juvenis de *M. rosenbergii* (Briggs et al., 1988; Sheen e D'Abramo, 1991). No início deste século, começaram a ser desenvolvidos alguns estudos nutricionais mais completos com larvas de *M. rosenbergii* (Kovalenko et al., 2002; Kamarudin e Roustaiain, 2002). Outros estudos na área da nutrição de camarões de água doce, em

especial do gênero *Macrobrachium*, foram também desenvolvidos recentemente (Cavalli et al., 1999; Hari e Kurup, 2002; Pezzato et al., 2003; Hari e Kurup, 2003; Mitra et al., 2005; Teshima et al., 2006; Luna et al., 2007). No entanto, tanto para camarões de água doce quanto para os marinhos, existem poucas informações disponíveis sobre as exigências nutricionais das larvas (Jones, et al., 1997<sup>b</sup>). Uma revisão da literatura atualizada sobre a nutrição de *Macrobrachium* está sumarizada neste capítulo de introdução geral, incluindo quatro temas: exigências de minerais, lipídeos, proteína e vitaminas.

### 1.2.1 Minerais

São poucos os dados disponíveis, concernentes às exigências de minerais em crustáceos. Basicamente, eles são exigidos na reprodução, embriogêneses ou nos primeiros estágios de desenvolvimento larval (Harrison, 1997). Os minerais são necessários para o funcionamento normal dos processos vitais dos crustáceos, estando envolvidos na regulação do equilíbrio osmótico ácido-base, na transferência de elétrons, na osmorregulação e na atividade de várias enzimas. Nas décadas de 70 e 80, as pesquisas sobre a utilização de minerais pelo *M. rosenbergii* foram deixadas de lado, baseando-se na suposição de que a maior parte das necessidades em minerais poderia ser fornecida pela absorção direta do ambiente aquático (Zimmerman, 1998).

A exigência de minerais para larvas de crustáceos marinhos e de água doce é pouca conhecida. Merchie (1996) determinou a composição mineral da *Artemia* e encontrou 18 minerais, alguns elementos traço, e mostrou que em alguns casos selênio não estava presente em quantidade suficiente. Alguns estudos em salmonídeos mostraram que a deficiência de selênio produz decréscimo do crescimento e diminuição da atividade glutationala peroxidase plasmática (Lovell, 1998; Roberts, 2002). Geralmente, dietas balanceadas contendo mais do que 15% de farinha de peixe apresentam concentrações adequadas de selênio (Sampaio et al., 2004). Estes mesmos autores recomendam para juvenis de *M. amazonicum* 0,50 mg de selênio/kg de ração, o que resulta em maior ganho em peso e conversão alimentar.

A importância fisiológica do Ca e do P em crustáceos é bem documentada (Wang et al., 2003; Rukke, 2002). Devido às características químicas, o íon cálcio não é somente um agente regulador de processos fisiológicos, mas também o principal cátion usado na mineralização de estruturas anatômicas nos crustáceos (Neufeld e Cameron 1993). As brânquias e o epitélio da carapaça apresentam fluxos de cálcio que variam

consideravelmente em magnitude e direção, de acordo com o estágio do ciclo de muda (Neufeld e Cameron, 1993). <sup>2</sup>Lall (1979), citado por Chavez-Sanchez et al. (2000), relatou que a exigência de cálcio pode ser afetada pela concentração de íons na água, diferenças entre espécies e pelos níveis de fósforo na dieta. O íon cálcio é importante para todos os sistemas biológicos já que participa de várias reações enzimáticas, é componente vital dos mecanismos de secreção hormonal, da neurotransmissão e da contração muscular. Em camarões de água doce e marinhos este mineral é muito importante já que constitui parte da composição do exoesqueleto, o qual esta amplamente mineralizado com carbonato de cálcio (Wang et al., 2003).

Por outro lado, o fósforo na forma de íon fosfato faz parte da estrutura dos compostos de alta energia como o ATP e a creatinina fosfato, de cofatores como o NAD, NADP, tiamina-pirofosfato, e de lipídios como a fosfatidilcolina (Pezzato et al., 2004). Embora o fósforo nos crustáceos esteja presente numa quantidade menor quando comparado ao cálcio ele é componente chave dos fosfolipídios da cutícula (Chandumpai et al., 1991). O fósforo também apresenta importante papel na função celular, sendo uma componente chave dos ácidos nucleicos, fosfolipídios, fosfoproteínas, ATP e de importantes enzimas (Goote et al., 1996). O fósforo também é um importante constituinte das membranas celulares e dos ácidos nucleicos, fazendo parte da composição dos ésteres de fosfato, que servem como substrato para fosfatos alcalinos, principalmente enzimas que estão implicadas nos processos de mineralização do carbonato de cálcio em invertebrados (<sup>3</sup>Arsenault et al., 1984; citado por Wang, et al., 2003). Estas enzimas, junto com a fosforilase e a anidrase carbônica, tem sido encontradas no complexo exoesquelético-epidérmico dos crustáceos (<sup>4</sup>Chockalingam, 1971; citado por Wang, et al., 2003).

Segundo Mitra et al. (2005), o desempenho produtivo do camarão-da-malásia em águas com concentração de cálcio de 5 ppm é melhor do que quando o Ca é suplementado em nível de 3% da dieta. Estes mesmos autores relatam que quando a água apresenta concentrações de Ca superiores a 74 ppm, o nível de suplementação deve diminuir para 1,8% de Ca na dieta.

Níveis elevados de cálcio na dieta e na água podem ser desvantajosos, tal como relatado por Zimmerman et al. (1992). Estes autores verificaram que 3% de Ca na dieta

---

<sup>2</sup>Lall, S.P. 1979. Minerals in fish nutrition. *Proc. World Symp. Fishfish Nutr. Technol.* Hamburg, Berlin, 1, 85-97.

<sup>3</sup>Arsenault, A.L.; Castell, J.D.; Ottensmeyer, F.P. 1984. The dynamics of exoskeletal-epidermal structure during molt in juvenile lobster by electron microscopy and electron spectroscopic imaging. *Tissue Cell* 16, 93-106.

<sup>4</sup>Chockalingam, S. 1971. Studies on enzymes associated with calcification of the cuticle of the hermit crab *Clibanarius olivaceus*. *Mar. Biol.* 10, 169-182.

e 74 mg/L de CaCO<sub>3</sub> na água não são adequados para o bom desempenho do camarão-da-malásia. No entanto, 1,8% ou 3% de Ca na dieta e 74 mg/L ou 51 mg/L de CaCO<sub>3</sub> na água, respectivamente, favoreceu o desempenho em termos de sobrevivência e ganho em peso para esta espécie.

O zinco é vital para o metabolismo dos lipídeos, proteínas e carboidratos. É essencial para várias metaloenzimas, incluindo anidrase carbônica, fosfatase alcalina e carboxipeptidase (Pezzato et al., 2004). Um nível ótimo de zinco na formulação de rações para o *M. rosenbergii* não deve ultrapassar 90 mg/kg de dieta, já que valores superiores podem diminuir o crescimento e a conversão alimentar (Mittra et al., 2005).

### 1.2.2 Lipídeos

Os lipídeos são o quarto principal grupo de moléculas encontradas em todas as células (Voet et al., 2002). Segundo Nelson e Cox (2006) os lipídeos são compostos quimicamente diferentes entre si, mas apresentam na insolubilidade em água uma característica definidora e comum a todos. As funções biológicas dos lipídeos são tão diferentes quanto suas características químicas. Em muitos organismos, as gorduras e os óleos (derivados de ácidos graxos) são as principais formas de armazenagem de energia. Por outro lado, os fosfolipídeos e os esteróis são elementos estruturais de grande importância nas membranas biológicas (Nelson e Cox, 2006). Entre as principais classes de lipídeos, encontramos: ácidos graxos, triacilgliceróis, glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos, esteróides, terpenos, licopenos, carotenos e ceras. Representam fonte rica em energia (9,5 kcal/g) e são muito importantes na manutenção da estrutura e função da membrana celular.

O ótimo nível dietário de lipídeo para juvenis e adultos de crustáceos geralmente varia na faixa de 2 a 10% (Deshimaru et al., 1979; Davis e Robinson, 1986; Sheen e D'Abramo, 1991; Sheen, 1997). Contudo, estudos indicam que as exigências de lipídeos em crustáceos variam não unicamente entre espécies, mas também entre a fase larval e adulta dentro da mesma espécie, fazendo-se então necessário o desenvolvimento de estudos mais detalhados e especializados (Holme, et al., 2009).

Os camarões marinhos contêm níveis elevados de ácidos graxos altamente insaturados (<sup>5</sup>HUFA), dentre os mais importantes destacam-se o ácido eicosopentanóico (EPA) 20:5 n-3 e o ácido docosahexaenóico (DHA) 22:6 n-3. No entanto, as larvas apresentam capacidade limitada de converter o ácido linoléico 18:3 n-3 a EPA e DHA,

---

<sup>5</sup> HUFA: High Unsaturated Fatty Acid

isto devido à deficiência de uma enzima ( $\delta$ -5-desaturase) responsável por alongar e dessaturar ácidos poliinsaturados (<sup>6</sup>PUFA) (Sargent et al., 1997).

O nível de lipídeos em rações para juvenis e adultos de camarões de água doce está ao redor de 5%, sempre que sejam oferecidas fontes suficientes de ácidos graxos essenciais. As exigências de ácidos graxos altamente insaturados (HUFA) são relativamente pequenas. Ambos n-3 e n-6 HUFA, em níveis de até 0,075%, incrementam o ganho em peso e a conversão alimentar; também são exigidos o ácido linolênico 18:2 n-6 e o ácido linolênico 18:3 n-3 (Mittra et al., 2005). Segundo Fox et al. (1994), as proporções de ácidos graxos (n-3 e n-6) encontradas na carcaça de *M. rosenbergii* e do camarão marinho *P. monodon* são totalmente antagônicas. No primeiro, a porcentagem total de (n-3) é de 19,1% e no segundo, de 27,9%. No caso dos (n-6), *M. rosenbergii* apresenta 29% e o *P. monodon* 9,9%. Estes resultados também mostraram que a relação (n-3)/(n-6) é de 0,7 em *M. rosenbergii* e de 2,8 em *P. monodon*. Tanto o 18:2 n-6 quanto o 18:3 n-3 são essenciais para o *M. rosenbergii*, mas o valor nutritivo do ácido linolênico 18:3 n-3 parece ser maior (New, 1990; <sup>7</sup>Tacon, 1987 citado por Zimmerman, 1998).

Estudos sobre exigência lipídica total para larvas de camarões marinhos foram realizados no final da década de oitenta. A exigência lipídica total de *Penaeus monodon* varia entre 4,3 e 23,5% dependendo da fonte de alimento (Kurmalıy et al., 1989<sup>a</sup> e Kurmalıy et al., 1989<sup>b</sup>), já no *Penaeus japonicus* a exigência de lipídeo total é de somente 5,5% (Kanazawa, 1990).

### 1.2.2.1 Fosfolipídios

Os fosfolipídios são componentes essenciais dos lipídios de membrana e estão divididos em glicerofosfolipídios e esfingolipídios (Nelson e Cox, 2006). Fazem parte também das lipoproteínas de alta densidade que ajudam no transporte inicial de lipídios do hepatopâncreas para a hemolinfa (Gong et al., 2001), sendo essenciais no transporte do colesterol para o tecido alvo durante o processo de muda (Conklin et al., 1983). Segundo Anderson e De Silva (2003), os fosfolipídios têm mostrado melhora no crescimento e sobrevivência, aumentando as taxas de metamorfose em crustáceos. Holme et al., 2009 fizeram uma revisão sobre níveis fosfolipídios para juvenis de crustáceos (Tabela 2).

---

<sup>6</sup> PUFA: Polyunsaturated Fatty Acid

<sup>7</sup>Tacon, A.T.J. 1987. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp – a training manual. vols. 1 (Essential Nutrients) e 2 (Nutrient Sources and Composition). Brasília, DF, GCP/RLA/075/ITA. Field Documents 2/E e 5/E. June 1987.

Tabela 2. Níveis de fosfolípidios usados em estudos nutricionais em juvenis de crustáceos.

Espécies	Nível de fosfolípido	Referencia
<i>Penaeus monodon</i>	1,25%	Chen (1993)
<i>P. monodon</i>	2%	Merican e Shim (1996)
<i>P. japonicus</i>	1%	Kanazawa et al. (1971)
<i>P. japonicus</i>	3%	Teshima et al. (1986)
<i>P. merguensis</i>	1-2%	Thongrod e Boonyaratpulin (1998)
<i>P. chinensis</i>	2%	Kanazawa (1993)
<i>P. vannamei</i>	0-5%	Gong et al. (2001)
<i>P. vannamei</i>	3%	Pascuala et al. (2002)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	0%	Hilton et al. (1984)
<i>M. rosenbergii</i>	5%	Briggs et al. (1988)
<i>Homarus americanus</i>	0-8%	Conklin et al. (1980)
<i>H. americanus</i>	0-6%	Kean et al. (1985)
<i>Panulirus penicillatus</i>	1,25%	Chen e Jenn (1991)
<i>Cherax quadricarinatus</i>	0-2%	Thompson et al. (2003)

Adaptado de Holme et al. (2009)

### 1.2.3 Proteínas

Uma lista completa de funções conhecidas das proteínas teria vários itens, incluindo proteínas que transportam outras moléculas e proteínas que geram forças mecânicas e eletroquímicas. As proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes que ocorrem em todas as células e em todas as partes das células. As proteínas também ocorrem em grande variedade; milhares de espécies diferentes, variando em tamanho dos relativamente pequenos peptídeos até polímeros enormes com pesos moleculares de milhões, podem ser encontradas em uma única célula (Nelson e Cox, 2006). As proteínas estão compostas por aminoácidos, os quais são nutrientes essenciais exigidos por todos os animais para crescimento (Glencross, 2006). Um bom entendimento das exigências em proteína é um fator chave para o desenvolvimento de uma dieta bem balanceada e a um baixo custo (Holme et al., 2009).

Segundo Mitra et al. (2005), reprodutores de *M. rosenbergii* criados em viveiros com alimento natural disponível (micro e macro fauna bêntica) precisam de aproximadamente 30% de proteína na dieta. Rações variando entre 35 e 40% de proteína e um nível de energia bruta de 3200 kcal/kg são suficientes para o crescimento desta espécie criada em sistemas de águas claras, nos quais não se têm suplemento de alimento natural. Estes autores ainda afirmaram que conteúdos de proteína na ração, variando entre 24 e 32%, vêm sendo utilizados em vários países asiáticos, durante a fase

de crescimento desta espécie. Alguns estudos sobre exigências protéicas já foram realizados em larvas de camarões peneídeos; em *P. monodon* foi determinada exigência de 30% de proteína bruta (PB) com dieta microparticulada (Khannapa, 1979), de 48-52% de PB com dietas vivas ou de 51-56% de PB com dieta encapsulada (Kurmaly et al., 1989<sup>a</sup>); no caso do *P. japonicus* foi verificada exigência de 44 % de PB (Besbes, 1987) e de 45-55% PB fornecendo 15-25% de carboidrato na dieta (Kanazawa, 1990).

Os crustáceos não precisam de uma quantidade específica de proteína, mas exigem uma suplementação equilibrada de aminoácidos essenciais. Uma efetiva fonte protéica dietária deve satisfazer as exigências em aminoácidos essenciais e não essenciais (Guillaume, 1997). Os aminoácidos essenciais dos crustáceos são bem conhecidos em estudos com adultos de varias espécies, incluindo *Penaeus serratus* (Cowey e Forster, 1971), *P. aztecus* (Shewbart et al., 1972), *Homarus americanus* (Gallagher e Brown, 1975), *M. rosenbergii* (Watanabe, 1975), *P. monodon* (Coloso e Cruz, 1980), *P. japonicus* (Kanazawa et al., 1981). Todos estes estudos concordaram e indicaram que arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina são aminoácidos essenciais na dieta dos crustáceos (Holme et al., 2009). No entanto, tirosina e cisteína deveriam ser consideradas aminoácidos semi-essenciais já que a sua presença na dieta reduz a exigência de fenilalanina e metionina, respectivamente (Guillaume, 1997). O perfil dos aminoácidos presente nas proteínas é decisivo para sua qualidade e determina seu valor como componente da dieta.

As necessidades quantitativas de aminoácidos essenciais para larvas e juvenis de *M. rosenbergii* são ainda desconhecidas, sendo comuns as formulações com excesso de proteína nas dietas. Portanto, estas rações podem estar desbalanceadas em sua composição de aminoácidos. Erros como estes ocorrem devido à falta de informações sobre as necessidades nutricionais. Por outro lado, Ronnestad et al. (1999) mostraram em estudos com peixes que os aminoácidos livres são utilizados como fonte de energia para o metabolismo, assim como são indispensáveis para o desenvolvimento embrionário e larval. A concentração de aminoácidos livres (AL) em muitos crustáceos é maior do que em tecidos de vertebrados (Claybrook, 1983). Os aminoácidos livres (AL) também têm importante função na osmorregulação intracelular de espécies eurihalinas (Claybrook, 1983).

#### 1.2.4 Vitaminas

As vitaminas são nutrientes essenciais para as células dos crustáceos. Muitas delas funcionam como coenzimas e geralmente são exigidas em pequenas quantidades, além de agir em diversos processos metabólicos e imunológicos. Pouco se conhece sobre as exigências de vitaminas em dietas para crustáceos (Harrison, 1997). Os crustáceos, da mesma forma que os vertebrados, não conseguem sintetizar a vitamina C, já que não apresentam uma enzima que possibilita sua síntese a partir da glicose (Lovell, 1998). A vitamina C também tem papel fundamental no mecanismo de síntese de quitina para a formação do exoesqueleto (<sup>8</sup>Paul Raj, 1997 citado por Manush et al., 2005). Hari e Kurup (2002) afirmam que, para se obter crescimento normal e elevada sobrevivência em juvenis de *M. rosenbergii* (74 ± 16 mg de peso), a exigência de vitamina C (ácido L-ascórbico-2-polifosfato) é de 135 mg/kg de dieta.

Por outro lado, Mitra et al. (2005) consideram apropriados para a reprodução e viabilidade da progênie do plantel de reprodutores de *M. rosenbergii* níveis de suplementação de 60 mg de ácido ascórbico e 300 mg de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) por quilograma de dieta. No entanto, estes mesmos autores relataram que, alimentando fêmeas com altos níveis destas duas vitaminas, cerca de 900 mg/kg de cada uma na dieta, melhora a qualidade das larvas e uma alta tolerância ao estresse causado pela presença de amônia.

A vitamina E é o mais importante antioxidante metabólico presente na membrana celular, protegendo-a da oxidação de ácidos graxos e do colesterol, além de diminuir ou inibir a produção e a ação dos radicais livres (Sampaio et al., 2004). Também é responsável pela manutenção da permeabilidade dos capilares e músculos cardíacos e parece estar envolvida com a respiração celular e a biossíntese de DNA (Steffens, 1989). Corbin (1993) recomendou para o *M. rosenbergii*, na fase de crescimento final, a inclusão na ração de 4,10 mg/kg de vitamina E. Em um estudo, com juvenis do camarão-da-amazônia (*M. amazonicum*) com peso médio de 280 mg, recomendara-se 200 mg/kg de vitamina E (DL- $\alpha$ -tocoferol), de modo a proporcionar melhores resultados de desempenho produtivo, ganho de peso e conversão alimentar (Sampaio et al., 2004).

---

<sup>8</sup>Paul Raj, J. 1997. Introduction. In: Aquaculture Feed, Handbook on Aquafarming. MPEDA publication.

### 1.2.5 Alterações nutricionais durante o ciclo da muda

A muda é o resultado de uma série de processos metabólicos e morfológicos que, mediante a eliminação do exoesqueleto (exúvia), permite o crescimento dos crustáceos (Barnabé, 1996). Os fisiologistas geralmente reconhecem quatro estágios no ciclo de muda: pré-muda, muda, pós-muda e intermuda (Rupert e Barnes, 1996). A fase preparatória de pré-muda é caracterizada pelo acúmulo de reservas alimentares e pela elevação do cálcio na hemolinfa, provavelmente resultante da reabsorção deste mineral a partir do exoesqueleto (Rupert e Barnes, 1996). O gastrólito, uma concreção calcária secretada pelo epitélio gástrico, também funciona como centro de armazenamento de cálcio durante a pré-muda. Logo após, a separação da cutícula velha e a secreção da nova epicutícula e exocutícula, os crustáceos preparam-se para um processo breve de muda (Rupert e Barnes, 1996). Depois iniciam o influxo de água por meio das brânquias ou do intestino médio, e com ajuda das secreções digestivas dissolvem o gastrólito, reabsorvendo os sais de cálcio na hemolinfa, os quais serão fundamentais na fase seguinte (pós-muda) para o processo de calcificação e de endurecimento do exoesqueleto. Na intermuda as reservas orgânicas se reconstituem e se acumulam no hepatopâncreas. Estas reservas são essencialmente constituídas por lipídeos (triglicérides) e em menor proporção por proteínas que serão utilizadas para o crescimento somático. Outra importante reserva são os carboidratos (glicogênio e glicose) substratos para síntese de quitina, além de minerais como cálcio e magnésio que também auxiliam na formação do exoesqueleto (Barnabé, 1996).

O presente estudo está inserido numa linha de pesquisa que vem sendo trabalhada há alguns anos no Setor de Carcinicultura de Água Doce do CAUNESP, visando obter informações sobre o comportamento alimentar do camarão-da-malásia (*M. rosenbergii*) e recentemente do camarão-da-amazônia (*M. amazonicum*), na fase larval. Nesta pesquisa pretendeu-se sair um pouco da linha de comportamento alimentar e entrar no campo da nutrição, mais especificamente no que se refere às exigências nutricionais das larvas em termos de minerais (Ca e P), lipídeo e proteína. Procurou-se aprimorar a qualidade nutricional da dieta inerte atualmente utilizada pela maioria das larviculturas, melhorando assim, o desempenho produtivo em termos de número de pós-larvas produzidas por litro.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

A presente pesquisa teve como objetivo estudar alguns aspectos da nutrição do camarão-da-malásia *Macrobrachium rosenbergii* durante a fase larval.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer o efeito da suplementação de cálcio e fósforo na ração das larvas de *M. rosenbergii*, alimentadas com dieta inerte úmida (pudim de ovo) e náuplios de *Artemia*, sobre o desempenho produtivo, principalmente em termos de número de pós-larvas produzidas por litro.
- Estabelecer o efeito da suplementação lipídica na ração das larvas de *M. rosenbergii*, alimentadas com náuplios de *Artemia* e dieta inerte úmida contendo diferentes níveis de lipídeo e seu efeito no desempenho produtivo, principalmente em termos de número de pós-larvas produzidas por litro.
- Estabelecer o efeito da suplementação protéica na ração das larvas de *M. rosenbergii*, alimentadas com náuplios de *Artemia* e dieta inerte úmida contendo diferentes níveis de proteína e seu efeito no desempenho produtivo, principalmente em termos de número de pós-larvas produzidas por litro.

## 3. REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, F.A., MELO, M.A. 2002. Morfologia comparativa do estômago do primeiro e último estágios zoea e juvenil de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) (Decapoda:Palaemonidae). Revista Ciência Agronômica, Vol. 33, N<sup>o</sup>. 2. 5-12 p.
- ALAM, M.J.; ANG, K.J.; CHEAH, S.H. 1993. Use of *Moina micrura* (Kurz) as an *Artemia* substitute in the production of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) post-larvae. Aquaculture 109, 337-349 p.
- ANDERSON, T.; De Silva, S. 2003. Nutrition. In: LUCAS, J.S.; SOUTHGATE, P.C. (Eds), Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants. Blackwell Publishing, Victoria, Australia, 146-171 p.
- BARNABÉ, G. 1996. Bases biológicas e ecológicas de la acuicultura: Bases biológicas de los cultivos de los crustáceos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 219-280 p.

- BARROS, H.P., VALENTI, W.C. 1997. Comportamento alimentar do camarão de água doce, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Crustácea, Palaemonidae) durante a fase larval: análise qualitativa. *Revista Brasileira de Zoologia*, 14 (4): 785-793 p.
- BARROS, H.P., VALENTI, W.C. 2003<sup>a</sup>. Ingestion rates of *Artemia* nauplii for different larval stages of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 217, 223-233 p.
- BARROS, H.P., VALENTI, W.C. 2003<sup>b</sup>. Food intake of *Macrobrachium rosenbergii* during larval development. *Aquaculture* 216, 165-176 p.
- BASKERVILLE-BRIDGES, B., KLING, L.J. 2000. Early weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae onto a microparticulate diet. *Aquaculture* 189, 109 – 117 p.
- BESBES, R. 1987. Elaboration de microparticules alimentaires destinées a remplacer la nourriture vivante dans l'élevage des larves de la crevette *P. japonicus* (Crustacea Decapoda). Mémoire diplôme Institut National Recherche Agronomique, Rennes, France.
- BRIGGS, M.; JAUNCEY, K.; BROWN, J. 1988. The cholesterol and lecithin requirement of juvenile prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) fed semi-purified diets. *Aquaculture* 70, 121-129.
- CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161-180 p.
- CAVALLI, R.O.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P. 1999. Performance of *Macrobrachium rosenbergii* broodstock fed diets with different fatty acid composition. *Aquaculture* 179, 387-402 p.
- CHANDUMPAL, A.; DALL, W.; SMITH, D.M. 1991. Lipid-class composition of organs and tissues of the tiger prawn *Penaeus esculentus* during the molting cycle and during starvation. *Marine Biology* 108, 235-246 p.
- CHAVEZ-SANCHEZ, C., MARTINEZ-PALACIOS, C.A., MARTINEZ-PEREZ, G., ROSS, L.G. 2000. Phosphorus and calcium requirement in the diet of the American cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther). *Aquaculture Nutrition* 6, 1-9 p.
- CLAYBROOK, D.L. 1983. Nitrogen Metabolism. In: *The Biology of Crustacea*, Vol. 5. (Cap. 3) Academic Press. pp. 163-213.
- COLOSO, R.; CRUZ, L. 1980. Preliminary studies in some aspects of amino acid biosynthesis in juveniles of *Penaeus monodon*. I. Incorporation of the <sup>14</sup>C from (U<sup>14</sup>C) acetate into amino acids of precipitable proteins. *Bulletin Phil. Biochemistry Society* 3, 12-22 p.
- CONKLIN, D.E.; D'ABRAMO, L.R.; NORMAN-BOUDREAU, K. 1983. Lobster nutrition. In: McVEY, J.P.; MOORE, J.R. (Eds.), *CRS Handbook of Mariculture. Crustacean Aquaculture*. CRC Press Inc. Boca Raton, USA. 413-423.
- CORBIN, J.S. 1993. Feeding practices and nutritional considerations for *Macrobrachium rosenbergii* culture in Hawaii. In: McVEY, U. *CRS Handbook of Mariculture*. Florida: Boca Raton, v1. 392-412 p.
- COWEY, C.; FORSTER, J. 1971. The essential amino acid requirement of the prawn *Palaemon serratus*. The growth of prawn on diets containing proteins of different amino acid composition. *Marine Biology* 10, 77-81 p.
- CUZON, G.; LAWRENCE, A.; GAXIOLA, G.; ROSAS, C.; GUILLAUME, J. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235, 513-551 p.
- D'ABRAMO, L.R., SHEEN, S.S. 1994. Nutritional requirements, feed formulation and feeding practices for intensive culture of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Rev. Fish. Sci.* 2, 1-21 p.

- D'ABRAMO, L.R. 1998. Nutritional requirements of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: comparisons with species of penaid shrimp. *Reviews in Fisheries Science* 6:153-163.
- DANADAPAT, J., CHAINY, G.B.N., RAO, K.J. 2003. Lipid peroxidation and antioxidant defense status during larval development and metamorphosis of giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135. 221-233 p.
- DANIELS, W.H., D'ABRAMO, L.R. & PARSEVAL, L.D. 1992. Design and management of closed, recirculating "Clearwater" hatchery system for freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* De Man 1879. *Journal of Shellfish Research* 11:65-73.
- DAVIS, D.A.; ROBINSON, E.H. 1986. Estimation of the dietary lipid requirement level of the white crayfish *Procambrus acutus acutus*. *Journal of World Aquaculture Society* 17, 37-43p.
- DESHIMARU, O.; KUROKI, K.; YONE, Y. 1979. The composition and level of dietary lipid appropriate for growth of prawn. *Bulletin Japanese Society Science Fisheries* 45, 591-594 p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2008. Glossary of Aquaculture. Compiled by Valerio Crespi and André Coche. Italy, Rome.401 p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2009. Yearbook of fishery statistics: summary tables. Roma. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/fi/STAT/summary/default.htm#aqua> Acesso em: 11 de janeiro de 2009.
- FOX, C., BROWN, J.H. & BRIGGS, M. 1994. The nutrition of prawns and shrimp in aquaculture – a review of recent research. In *Recent Advances in Aquaculture V*, (Ed. by J.F. Muir & R.J. Roberts), pp. 131-206. Blackwell Science, Oxford.
- GALLAGHER, M.; BROWN, W. 1975. Amino acid requirements of the lobster (*Homarus americanus*). *Fed. Proc.* 34, 800 p.
- GARCIA-ORTEGA, A., VERRETH, J.A.J., COUTTEAUT, P., SEGNER, H., HUISMAN, E.A., SORGELOOS, P. 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture* 161. 501-514 p.
- GLENCROSS, B.D. 2006. The nutritional management of barramundi, *Lates calcarifer* – a review. *Aquatic Nutrition* 12, 291-309.
- GOOTE, T.A.; HONE, P.W.; KENYON, R.; MAGUIRE, G.B. 1996. The effect of different combinations of dietary calcium and phosphorus on the growth of juvenile *Haliotis laevigata*. *Aquaculture* 145, 267-279.
- GONG, H.; LAWRENCE, A.L.; GATLIN, D.M.; JING, D.H.; ZHANG, F. 2001. Comparison of different types and levels of commercial soybean lecithin supplement in semi-purified diets for juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Boone Aquaculture Nutrition* 7, 11-17 p.
- GUERRERO-ALVARADO, C.E. 2003. Treinamento alimentar de pintado *Pseudoplatystoma coruscans*: sobrevivência, crescimento e aspectos econômicos. Dissertação (Mestrado). Centro de Aqüicultura – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 72 p.
- GUILLAUME, J. 1997. Protein and amino acids. In: D'ABRAMO, L.R.; CONKLIN, D.; AKIYAMA, D. (Eds.). *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- GUPTA, A., SINGH, H.S, KAUR, G.S. 2007. Growth and carcass composition of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), fed different isonitrogenous and isocaloric diets. *Aquaculture Research* 38. 1355-1363 p.

- HARI, B.; KURUP, B.M. 2002. Vitamina C (Ascorbyl 2 Polyphosphate) Requirement of Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Asian Fisheries Science 15. 145-154 p.
- HARI, B.; KURUP, B.M. 2003. Comparative evaluation of dietary protein levels and plant-animal protein ratios in *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture Nutrition 9. 131-137 p.
- HARRISON, K.E. 1997. Broodstock nutrition and maturation diets. In: Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture, Volume 6. D'ABRAMO, L.R.; CONKLIN, D.E. & AKIYAMA, D.M.(Editors). World Aquaculture Society. pp. 390-408.
- HART, P.R., PURSER, G.J. 1996. Weaning of hatchery-reared greenback flounder (*Rhombosolea tapirina* Günther) from live to artificial diets: Effects of age and duration of the changeover period. Aquaculture 145, 171 – 181 p.
- HOLME, M.H.; ZENG, C.; SOUTHGATE, P.C. 2009. A review of recent progress toward development of a formulated microbound diet for mud crab, *Scylla serrata*, larvae and their nutritional requirements. Aquaculture 286, 164-175 p.
- HUNG, L.T., TAM, B.M., CACOT, P., LAZARD, J., 1999. Larval rearing of the mekong catfish, *Pangasius bocourti* (Pangasiidae, Siluroidei): substitution of *Artemia* nauplii with live and artificial feed. *Aquat. Living Resour.* 12 (3), 229 – 232 p.
- HUNG, L.T., TUAN, N.A., CACOT, P., LAZARD, J. 2002. Larval rearing of Asian catfish, *Pangasius bocourti* (Siluroidei, Pangasiidae): alternative feeds and weaning time. Aquaculture 212, 115 – 127 p.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. 2008. Estatística da Pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação. IBAMA, Brasília. 174 p.
- JOMORI, R.K. 2005. Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do Pacu *Piaractus mesopotamicus* e o uso dos isótopos estáveis de carbono (<sup>13</sup>C) e nitrogênio (<sup>15</sup>N) como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval. Tese (Doutorado). Centro de Aqüicultura – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 121 p.
- JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MARTINS, M.I.E.G.; PORTELLA, M.C. 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. Aquaculture 243, 175-183 p.
- JONES, D.A., KURMALY, K., ARSHARD, A. 1987<sup>a</sup>. Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. Aquaculture 64, 133-146 p.
- JONES, D.A.; YULE, A.B.; HOLLAND, D.L. 1987<sup>b</sup>. Larval Nutrition. In: Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture, Volume 6. D'ABRAMO, L.R.; CONKLIN, D.E. & AKIYAMA, D.M.(Editors). World Aquaculture Society. pp. 353-389.
- JONES, D.A.; KUMLU, M.; LE VAY, L.; FLETCHER, D.J. 1997. The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. Aquaculture 155. 285-295 p.
- KAMARUDIN, M.S.; ROUSTAIAAN, P. 2002. Growth and fatty acid composition of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, larvae fed diets containing various ratios of cod liver oil-corn oil mixture. Journal Applied Ichthyology. 18. 148-153p.
- KANAZAWA, A.; TESHIMA, S.; MATSUMOTO, S.; NOMURA, T. 1981. Dietary protein requirement of the shrimp *Metapenaeus monoceros*. Bulletin Japanese Society Science Fisheries 47, 1371-1374.
- KANAZAWA, A. 1990. Microparticulate feeds for penaeid larvae. Advances in tropical aquaculture. Actes de Colloque 9. AQUACOP.INFREMER.Tahiti. pp. 395-404.

- KHANNAPA, A. 1979. Effect of various protein levels on growth and survival rates for *Penaeus monodon*. Quaternary Research Report, vol. 1. Aquaculture Department, South East Asian Fisheries Development Centre. pp. 24-48.
- KERDCHUEN, N., LEGENDRE, M. 1994. Larval rearing of an African catfish, *Heterobranchus longifilis*, (Teleostei, Clariidae): a comparison between natural and artificial diet. *Aquat. Living Resour.* 7, 247 – 253 p.
- KOSHIO, S., KANAZAWA, A., TESHIMA S.I., CASTELL, J.D. 1989. Nutritional evaluation of crab protein for larval *Penaeus japonicus* fed microparticulate diets. *Aquaculture* 89, 145-154 p.
- KOVALENKO, E.E., D'ABRAMO, L.R., OHS, C.L., BUDDINGTON, R.K. 2002. A successful microbound diet for the larval culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 210, 385-395 p.
- KURMALY, K.; YULE, A.B.; JONES, D.A. 1989<sup>a</sup>. An energy budget for the larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture* 81. 13-25 p.
- KURMALY, K., JONES, D.A., YULE, A.B. & EAST, J.1989<sup>b</sup>. Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae, from protozoa I to postlarvae I, on live feeds, artificial diets and on combinations of both. *Aquaculture* 81:27-45.
- LANGDON, C.J.; LEVINE, D.M.; JONES, D.A. 1985. Microparticulate feeds for marine suspension-feeders. *Journal of Microencapsulation* 2 (11), 1-11 p.
- LAVENS, P.; SORGELOOS, P. 1998. Present status and prospects of the use of *Artemia* cysts and biomass in shrimp farming. In: Brasil 98: Aqüicultura. Recife. Anais...v.1, 147-159 p.
- LAVENS, P., THONGROD, S., SORGELOOS, P. 2000. Larval prawn feeds and the dietary importance of *Artemia*. In: New, M.B., Valenti, W.C. (Eds.), *Freshwater Prawn Culture: The farming of *Macrobrachium rosenbergii**. Blackwell Science Ltd. Oxford-United Kingdom. 91-111 p.
- LOVELL, R.T. 1998. *Nutrition and feeding of fish*. 2 ed. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers. 267 p.
- LUNA, M.; GRAZIANI, C.; VILLARROEL, E.; LEMUS, M.; LODEIROS, C.; SALAZAR, G. 2007. Evaluación de tres dietas con diferente contenido proteico en el cultivo de postlarvas del langostino de río *Macrobrachium rosenbergii*. *Zootecnia Tropical*. Vol.25, no. 2. 1-13 p.
- MALLASEN, M., VALENTI, W.C. 2008. Criação de camarão-de-água-doce. Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão (Funep). Jaboticabal, SP. 45 p.
- MANUSH, S.M.; PAL, A.K.; DAS, T.; MUKHERJEE, S.C. 2005. Dietary high protein and vitamin C mitigate stress due to chelate claw ablation in *Macrobrachium rosenbergii* males. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 142. 10-18 p.
- MERCHIE, G. 1996. Use of nauplii and meta-nauplii. In *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*, (Ed. by P. Lavens & P. Sorgeloos). *FAO Fisheries Technical Paper* 361. FAO, Rome. 137–163 p.
- MITRA, G.; CHATTOPADHYAY, D.N.; MUKHOPADHYAY, P.K. 2005. Nutrition and Feeding in Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Farming. *Aqua. Feeds: Formulation & Beyond*, Volume 2, Issue 1. 17-19 p.
- NAEGEL, L.C.A. 1999. Controlled production of *Artemia* biomass using an inert commercial diet, compared with microalgae *Chaetoceros*. *Aquacultural Engineering* 21, 49-59 p.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. 2006. Aminoácidos, peptídeos e proteínas (Capítulo 3) In: *Princípios de Bioquímica (Lehninger)*. Editora Sarvier, quarta edição. 74-113 p.
- NEW, M.B. 1990. Freshwater prawn culture: a review. *Aquaculture* 88, 99-143 p.

- NEW, M.B. 1995. Status of freshwater prawn farming: a review. *Aquaculture Research* 26. 1-54 p.
- NEW, M.B. 2002. Farming freshwater prawns: A manual for the culture of giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). FAO Fisheries Technical Paper. No. 428. Rome, FAO. 212p.
- NEW, M.B. 2005. Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. *Aquaculture Research* 36. 210-230 p.
- NEUFELD, D.S., CAMERON, J.N. 1993. Trans epithelial movement of calcium in crustacean. *Journal of Experimental Biology*. 184, 1-16 p.
- OHS, C.L., D'ABRAMO, L.R., BUDDINGTON, R.K., ROBINETTE, H.R., ROETHKE, J.M. 1998. Evaluation of a spray-dried artificial diet for larval culture of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture Nutrition* 4, 73-82 p.
- PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; SAMPAIO, F.G.; FALCON, D.R.; GONÇALVES, G.S.; HISANO, H. 2003. Relação energia:proteína dietária para pós-larvas de *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. v. 25, no, 2. 235-241 p.
- PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FRACALLOSSI, D.M.; CYRINO, J.E.P. 2004. Nutrição de peixes. Em: Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. CYRINO, et al. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática. 75-169 p.
- ROBERTS, R.J. 2002. Nutritional Pathology. In J.E. Halver and R.W. Hardy, editors. *Fish Nutrition* 3ed. 453-504 p.
- RODRIGUES, J.B.R.; ZIMMERMANN, S. 2004. Cultivo de camarões de água doce (Cap. VII). Em: Aqüicultura, Experiências Brasileiras. POLI, et al. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aqüicultura. 145-198 p.
- RONNESTAD, I., THORSEN, A., FINN, R.N. 1999. Fish larval nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture* 177. 201-216 p.
- ROUSTAIAN, P., KAMARUDIN, M.S., OMAR, H., SAAD, C.R., AHMAD, M.H. 1999. Changes in fatty acid profile during the larval development of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research* 30, 815-824 p.
- ROUSTAIAN, P., KAMARUDIN, M.S., OMAR, H., SAAD, C.R., AHMAD, M.H. 2001. The effect of dietary lipid sources on the *Macrobrachium rosenbergii* larval performance, post larval production and fatty acid composition. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 16. 251-263 p.
- RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. 1996. Zoologia dos Invertebrados: Crustáceos. Capítulo 4. 6ª edição. Editora Roca Ltda. São Paulo/SP. 659-777 p.
- RUKKE, N.A. 2002. Effects of low calcium concentrations on two common freshwater crustaceans, *Gammarus lacustris* and *Astacus astacus*. *Functional Ecology* 16. 357-366 p.
- SALLES, F.A. 1998. Aspectos técnicos e econômicos da larvicultura intensiva do curimatá (*Prochilodus scrofa*) em escala massal. Dissertação (Mestrado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 53 p.
- SAMPAIO, F.G., KLEEMANN, G.K., DE CARNO E SÁ, M.V., PEREIRA, A.S., BARROS, M.M. e PEZZATO, LE. 2004. Níveis de vitamina E e de Selênio para pós-larvas de *Macrobrachium amazonicum*. *Acta Scientiarum, Animal Sciences*. V. 26 no. 1. 129-135 p.
- SARGENT, J.R., McENVOY, L.A., BELL, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 155. 117-127 p.

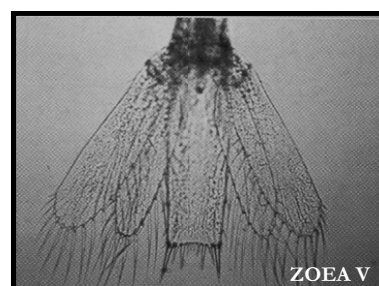
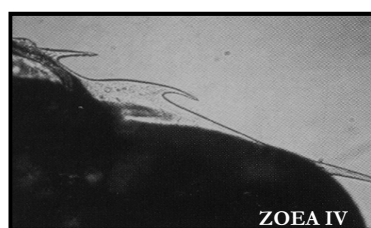
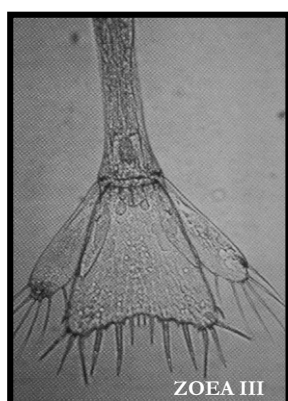
- SEVILLA, A., GÜNTHER, J. 2000. Growth and feeding level in pre-weaning Tambaqui *Collossoma macropomum* larvae. Journal of the World Aquaculture Society 31 (2), 218–224 p.
- SHEEN, S.S. 1997. Lipid supplementation of semi-purified diets for *Penaeus chinensis* juveniles. Journal Fishery Society Taiwan 24, 235-242 p.
- SHEEN, S.S.; D'ABRAMO, L.R. 1991. Response of juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to different levels of a cod liver oil/corn oil mixture in a semipurified diet. Aquaculture 93, 121-134 p.
- SHEWBART, K.; MIES, W.; LUDWIG, P. 1972. Identification and quantitative analysis of amino acids present in protein of the brown shrimp *Penaeus aztecus*. Marine Biology 16, 64-67 p.
- SHIAU, S.Y. 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps. Aquaculture 164. 77-93 p.
- SHORT, J.W. 2004. A revision of Australian river prawns, *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). Taxonomic revision. Hydrobiologia 525: 1-100 p.
- SILVA, F.M., RODRIGUES, J.B.R. 1997. Efeito da substituição de *Artemia* sp. pelo nematóide *Panagrellus redivivus* sobre o crescimento e sobrevivência larval do camarão de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*). Boletim do Instituto de Pesca 24 (especial): 35-48 p.
- STEFFENS, W. 1989. Principles of Fish Nutrition. Ellis Horwood Series Aquaculture and Fisheries Support. Halsted Press, John Wiley & Sons. New York, NY, USA
- STØTTRUP, J.G.; NORSKER, N.H. 1997. Production and use of copepods in marine fish larviculture. Aquaculture 155, 231-247 p. .
- TESHIMA, S.I.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M. 2006. Protein requirements of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* evaluated by the factorial method. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 37 No. 2. 145-153 p.
- VALENTI, W.C. 1993. Freshwater prawn culture in Brazil. World Aquaculture. Baton Rouge, v.24, n.1, 29-34 p.
- VALENTI, W.C. 1996. Criação de camarões em águas interiores. Boletim Técnico N 2. Jaboticabal-SP: FUNEP, 80 p.
- VALENTI, W.C. 2005. Carcinicultura de Água Doce na América Latina. LAC-WAS – Boletim do Capítulo Latino-americano da Sociedade Mundial de Aqüicultura – Boletim 03, abril de 2005.
- VETORELLI, M.P. 2008. Salinidade e composição iônica da água na larvicultura do camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum*. Tese de Doutorado, UNESP-Jaboticabal-SP, 123 p.
- VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. 2002. Fundamentos de Bioquímica, Cap. 9 Lipídeos. 1ª reimpressão. Artmed Editora S.A. 219-235 p.
- WANG, W.; WANG, A.; WANG, D.; WANG, L.; LIU, Y.; SUN, R. 2003. Calcium, phosphorus and adenylate levels and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activities of prawn, *Macrobrachium nipponense*, during the moult cycle. Comparative Biochemistry and Physiology Part A. 134. 297-305 p.
- WATANABE, W. 1975. Identification of the essential amino acids of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Master's Thesis, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, USA.
- WATANABE, T., KITAJIMA, C., FUJITA, S., 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture* 34, 115 – 143 p.
- WATANABE, T.; KIRON, V. 1994. Prospects in larval fish dietetics. Aquaculture 124, 223-251 p.

- ZIMMERMAN, S.; RAUPP, A.B. 1992. O cultivo de camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), em viveiros no sul do Brasil, sob diferentes densidades e taxas de estocagem. Pesquisa Agropecuária Brasileira. EMPRAPA, Brasília, 27 (1): 87-90.
- ZIMMERMAN, S. 1998. Manejo de alimentos e alimentação dos camarões. In: Valenti, W.C. (editor) Carcinicultura de Água Doce: tecnologia para a produção de camarões. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Brasília. 239-267 p.

# CAPÍTULO 2

## Artigo 1

### NÍVEIS DIETÉTICOS DE CÁLCIO E FÓSFORO NA FASE LARVAL DE *Macrobrachium rosenbergii*



FONTE DAS FOTOS: TAKUJI FUJIMURA

## NÍVEIS DIETÉTICOS DE CÁLCIO E FÓSFORO NA FASE LARVAL DE *Macrobrachium rosenbergii*

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado<sup>1</sup>, Wagner Cotroni Valenti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista/CAUNESP – Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

### RESUMO

A formulação de uma dieta balanceada que atenda as exigências dos minerais cálcio e fósforo nas larvas de *Macrobrachium rosenbergii*, é importante para garantir maior produtividade na larvicultura. Assim, avaliou-se o efeito de diferentes níveis de cálcio e fósforo na dieta sobre as principais variáveis de produção. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 3x3, correspondente a três níveis de cálcio (0,35; 1,00 e 1,90%) e três de fósforo (0,70; 1,50 e 2,30%), com três repetições realizadas em blocos temporais. Dois dias após a eclosão, as larvas passaram a ser alimentadas com quantidades crescentes de náuplios de *Artemia*. A partir do 11º dia (zoea VII), iniciou-se a co-alimentação, fornecendo-se as dietas-teste juntamente com os náuplios de *Artemia* até o final do ciclo de larvicultura. No 27º dia de cultivo, quando aproximadamente 90% das larvas metamorfosearam-se em pós-larvas (PL), realizou-se a despesca. Foi calculada a taxa de sobrevivência, a biomassa final de PL, a porcentagem de larvas e a produtividade (PL L<sup>-1</sup>) em cada tratamento. Observou-se que as larvas de *M. rosenbergii* alimentadas com dieta inerte contendo 0,35 ou 1,07% de Ca total, e 1,50% de P total (1,15% de P disponível) melhoraram significativamente a sobrevivência e o número de pós-larvas produzidas por litro ao final da larvicultura. A inclusão de 1% de P na forma de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e unicamente o Ca proveniente da dieta basal (0,35%) são adequados para melhorar o desempenho produtivo desta espécie.

**Palavras-chave:** cálcio, fósforo, camarão-da-malásia, larvicultura, minerais

## DIETARY LEVELS OF CALCIUM AND PHOSPHORUS IN THE LARVAL PHASE OF *Macrobrachium rosenbergii*

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado<sup>1</sup>, Wagner Cotroni Valenti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista/CAUNESP – Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil.

### ABSTRACT

The formulation of a balanced diet, which provides the requirements of calcium and phosphorus minerals for *Macrobrachium rosenbergii* larvae is important to guarantee good productivity of post-larvae. Hence, the effect of different levels of calcium and phosphorus in the inert diet on the principal production variables was evaluated during the hatchery. It was used a randomized block experimental design, in a 3x3 factorial scheme, with three levels of calcium (0.35; 1.00 and 1.90 %) and three levels of phosphorus (0.70; 1.50 and 2.30 %), with three replicates. Two days after hatching, larvae started feeding on increasing quantities of *Artemia* nauplii. Co-feeding started at the 11<sup>th</sup> day (zoea VII), when test-diets plus *Artemia* nauplii were supplied up to the end of the rearing cycle. In the 27<sup>th</sup> day, when approximately 90% of the larvae turned into post larvae (PL), harvest was done. Survival rate, final biomass of PL, percentage of larvae and productivity (PL L-1) were calculated in all treatments. *M. rosenbergii* larvae fed on inert diet containing 0.35 or 1.07 % of total Ca and 1.50 % of total P (1.15 % of P available) had significantly improved survival rate and productivity. Inclusion of 1.0 % of total P and only the dietary Ca from the basal diet (0.35%) are adequate to improve the productive performance on this specie.

**Keywords:** Calcium, Giant River Prawn, Phosphorus, Hatchery, Minerals

## NIVELES DIETÉTICOS DE CÁLCIO Y FÓSFORO EN LA FASE LARVAL DE *Macrobrachium rosenbergii*

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado<sup>1</sup>, Wagner Cotroni Valenti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista/CAUNESP – Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

### RESUMEN

La formulación de una dieta balanceada que atienda las exigencias de los minerales calcio y fósforo en las larvas de *Macrobrachium rosenbergii*, es importante para garantizar mejor productividad en la larvicultura. Así, se evaluó el efecto de diferentes niveles de calcio y fósforo en la dieta sobre las principales variables de producción. El diseño experimental fue en bloques completamente al azar, en esquema factorial 3x3, correspondiente a tres niveles de calcio (0,35; 1,00 e 1,90%) y tres de fósforo (0,70; 1,50 e 2,30%), con tres repeticiones realizadas en bloques temporales. Dos días después de la eclosión las larvas pasaron a ser alimentadas con cantidades crecientes de náuplios de *Artemia*. A partir del 11º día (zoea VII), se inició la alimentación conjunta, ofreciendo las dietas-teste acompañadas por los náuplios de *Artemia* hasta el final del ciclo de larvicultura. El 27º día del cultivo, cuando aproximadamente 90% de las larvas se metamorfosearon en postlarvas (PL), se realizó la cosecha. Fue calculada la tasa de sobrevivencia, biomasa final de PL, el porcentaje de larvas y la productividad (PL L<sup>-1</sup>) en cada tratamiento. Se observó que las larvas de *M. rosenbergii* alimentadas con dieta inerte conteniendo 0,35 ó 1,07% de Ca total, y 1,50% de P total (1,15% de P disponible) mejoraran significativamente la sobrevivencia y el número de postlarvas producidas por litro al final de la larvicultura. La inclusión de 1% de P en la forma de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y únicamente el Ca proveniente de la dieta basal (0,35%) son adecuados para mejorar el desempeño productivo de esta especie.

**Palabras clave:** calcio, camarón gigante de Malasia, fósforo, larvicultura, minerales

## DES NIVEAUX DIÉTÉTIQUES DE CALCIUM ET DE PHOSPHORE DANS DES PHASES DE LARVE DU *Macrobrachium rosenbergii*

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado<sup>1</sup>, Wagner Cotroni Valenti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista/CAUNESP – Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

### RÉSUMÉ

La formulation d'un régime alimentaire équilibré que puisse répondre aux besoins de calcium et de phosphore des larves de *Macrobrachium rosenbergii* est très important pour assurer des meilleures productivités à la fin de la larviculture. L'effet de différents niveaux de calcium et de phosphore sur le régime alimentaire a été évalué sur les principaux variables de production. Une délimitation complètement au hasard en schème factoriel 3x3, a été utilisé, en correspondant à trois niveaux de calcium (0,35; 1,00 et 1,90%) et trois niveaux de phosphore (0,70; 1,50 et 2,30%). Chaque traitement a eu 3 répétitions. Deux jours après l'éclosion les larves ont été nourries avec des quantités croissantes de nauplii d'*Artemia*. A partir du onzième jour (zoea VII), la co-alimentation a été introduite en fournissant les diètes-teste en plus des nauplii d'*Artemia* jusqu'à la fin du cycle de larviculture. Au 27ème jour du cycle où 90% des larves, à peu près, se sont déjà méthanorphosées en pos-larves (PL), la récolte de fin d'élevage a été faite. Le taux de survie, la biomasse finale de PL, la pourcentage de larves et la productivité (PL L<sup>-1</sup>) ont été calculés pour chaque traitement. On a pu observer que les larves de *M. rosenbergii* qu'ont été nourries par une diète inerte de 0,35 ou 1,07% de calcium total et 1,50% de P total (1,15% de P disponible) ont eu leurs taux le survie beaucoup améliorés aussi bien que le numero de pos-larves qu'ont été produites par litre à la fin da la larviculture. L'inclusion de 1% de P sur la forme de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et le Ca venu de la diète basal (0,35%) sont suffisants pour améliorer la production de cette espèce.

**Mots-clés:** calcium, Crevette géant d'eau douce, phosphore, larviculture, minéraux

## 1. INTRODUÇÃO

A formulação de uma dieta inerte balanceada que atenda as exigências nutricionais de cálcio, fósforo e da relação Ca:P para larvas de *Macrobrachium rosenbergii* é importante para garantir melhores taxas de sobrevivência e produtividade durante a larvicultura. Não obstante, estudos sobre a exigência destes minerais em crustáceos de água doce e marinhos são muito escassos. Da virada do século até hoje, foram desenvolvidas algumas pesquisas que determinaram as exigências de Ca e P para juvenis de camarões marinhos, principalmente das espécies *Penaeus monodon* (Peñaflorida, 1999) e *Litopenaeus vannamei* (Pan et al., 2005; Cheng et al., 2006). No entanto, não existem relatos na literatura científica que tenham determinado as exigências destes minerais em larvas ou pós-larvas de camarões de água doce do gênero *Macrobrachium*.

A criação de camarões de água doce é um dos setores da aquicultura que mais cresceram nos últimos anos em âmbito mundial Mallasen e Valenti (2008). De maneira especial, os camarões do gênero *Macrobrachium* apresentam considerável importância econômica, sendo bastante utilizados na dieta humana (Valenti, 1993). As espécies mais produzidas são *M. rosenbergii* e *M. nipponense* (FAO, 2009). Esta última apareceu nas estatísticas da FAO em 2000 e, desde 2003, supera a produção de *M. rosenbergii* (FAO, 2009). A larvicultura comercial destas espécies depende do uso de alimento vivo, basicamente de náuplios de *Artemia*. Não obstante, a compra e produção desses náuplios têm um custo elevado (Cahu e Zambonino-Infante, 2001; Hung et al., 2002), além de não atender todas as exigências nutricionais das larvas, fazendo-se necessária a alimentação conjunta com dieta inerte. A dieta inerte atualmente utilizada nas larviculturas comerciais dos camarões do gênero *Macrobrachium* é um creme de ovo ou pudim, composto pela mistura de ingredientes tais como: ovo de galinha, lula, file de peixe, leite em pó, farinha de trigo, óleo de peixe e suplemento vitamínico-mineral (Lavens et al., 2000). Nesta dieta não são adicionadas fontes artificiais de Ca nem de P, sendo que a fonte destes minerais encontra-se principalmente na água salobra do sistema de produção e em menor proporção, nos próprios ingredientes utilizados.

Juvenis de *Marsupenaeus japonicus* (Kanazawa et al., 1984) e *Fenneropenaeus merguensis* (<sup>9</sup>Sick et al., 1972; citado por Peñaflorida, 1999) têm uma exigência dietética de Ca de 1-2% e 0,66%, respectivamente. Juvenis de vários camarões marinhos tais como: *Litopenaeus vannamei*, *M. japonicus*, *Penaeus monodon*, *F. merguensis* e *Farfantepenaeus aztecus*, têm uma exigência nutricional de P variando entre 0,35% e 2% (Deshimaru e Yone, 1978; Kanazawa et al., 1984; <sup>10</sup>Li et al., 1986, citado por Cheng et al., 2006; Davis et al., 1993; Peñaflorida, 1999). A ótima relação Ca:P varia segundo as espécies: 1:1,7 para *Fenneropenaeus chinensis* (Li et al., 1986, citado por Cheng et al., 2006), 1:1 para *M. japonicus* (Kanazawa et al., 1984) e *P. monodon* (<sup>11</sup>Bautista e Baticados, 1990, citado por Peñaflorida, 1999) e 2,06:1 para *Farfantepenaeus californiensis* (<sup>12</sup>Huner e Colvin, 1977, citado por Peñaflorida, 1999).

Não existem relatos de estudos, durante a fase larval, da possível interação entre o cálcio e o fósforo dietético sobre o desempenho produtivo do camarão-da-malásia. Portanto, o objetivo da presente pesquisa foi determinar o efeito da suplementação de Ca e P na dieta para as larvas de *M. rosenbergii*, durante a fase de zoea VII até o momento da metamorfose em pós-larva (PL).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Origem dos animais e condições experimentais

As larvas de *M. rosenbergii* foram obtidas de fêmeas ovígeras capturadas nos viveiros do Setor de Carcinicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP (Jaboticabal, SP, Brasil). As fêmeas, com peso médio de  $40,3 \pm 7,7$  g, foram desinfetadas em solução de formaldeído 25 ppm por 20 minutos e, em seguida, transferidas para um tanque de eclosão com temperatura e salinidade da água variando de 29,7 a 30,7°C e 5,9 a 6,3‰, respectivamente. Larvas recém eclodidas (peso inicial  $26,04 \pm 2,95$  µg) foram coletadas, contadas, aclimatadas e estocadas nos tanques de larvicultura em uma densidade de 80

<sup>9</sup>Sick, L.V.; White, D.B.; Andrews, J.W. 1972. Preliminary studies of selected environmental and nutritional requirements for the culture of Penaeid shrimps. Fish. Bull. 70, 101-109.

<sup>10</sup>Li, A.J.; Huang, B.C.; Lou, W.F.; Xu, J.M. 1986. The effects of dietary calcium, phosphorus and Ca/P ratio on the growth and development of prawn (*Penaeus orientalis*). J. Shandong Coll. Oceanol. Shandong Haiyang Xueyuan Xuebao 16, 10-17 (in Chinese, with English abstract).

<sup>11</sup>Bautista, M.N.; Baticados, M.C.L. 1990. Dietary manipulation to control the chronic soft-shell syndrome in tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. In: Hirano, R.; Hanyu, I. (Eds), Proc. of the Second Asian Fisheries Forum, 17-22 April 1989, Tokyo, Japan. Asian Fish. Soc., Manila, Philippines, pp. 341-344.

<sup>12</sup>Hunner, J.V.; Colvin, L.B. 1977. A short term study of the effects with varied calcium:phosphorus ratios on the growth of juvenile shrimp, *Penaeus californiensis*. Proc. World Maricult. Soc. 8, 775-778.

larvas/L. Os nove tanques utilizados eram de cor preta, cilíndricos e de fundo cônico, com volume útil de 120 L, acoplados a biofiltros e operados em sistema fechado dinâmico (Valenti e Daniels, 2000). O volume do biofiltro correspondia a 25% do volume total do tanque de larvicultura. Utilizou-se cascalho de conchas de moluscos como substrato para bactérias nos biofiltros. O fotoperíodo utilizado foi 13:11 (claro:escuro). As seguintes variáveis da água foram monitoradas diariamente: temperatura (°C), pH, salinidade (‰), condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), oxigênio dissolvido (mg/L), nitrato ( $\text{NO}_3$  mg/L) e cálcio (mg/L). Para a medição destas variáveis foi usado um aparelho multiparâmetro (HORIBA, Modelo U-22XD). A taxa de recirculação da água do tanque de larvicultura pelo biofiltro (%/dia) também foi monitorada diariamente. A alcalinidade (mg/L) e o fósforo total (método do cloreto estanhoso -  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) foram medidos uma vez por semana, seguindo a metodologia da APHA (2005). A amônia ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) foi monitorada quatro vezes por semana, usando testes colorimétricos (Labcom Test<sup>®</sup>). Os valores médios em todos os tratamentos foram: temperatura  $30,2 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , pH  $7,92 \pm 0,01$ , salinidade  $12,08 \pm 0,04$  ‰, condutividade  $14,19 \pm 0,03$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ , oxigênio dissolvido  $7,00 \pm 0,07$  mg/L, saturação de oxigênio  $100,6 \pm 1,0$  %, nitrato  $130,6 \pm 4,3$  mg/L, alcalinidade  $50,8 \pm 3,4$  mg/L, amônia  $15,1 \pm 0,7$   $\mu\text{g}/\text{L}$  e taxa de recirculação da água de  $21,6 \pm 1,6$  %/dia. Estes valores foram mantidos dentro das faixas recomendadas por Valenti e Daniels (2000) para *M. rosenbergii*.

## 2.2. Alimentação das larvas e dietas experimentais

A partir das 48 horas após a eclosão e até o final do ciclo de larvicultura (27° dia) as larvas de todos os tratamentos foram alimentadas diariamente ao entardecer (18h 30min) com quantidades crescentes de náuplios de *Artemia* recém eclodidos (Tabela 1). Do 11° dia (Zoea VII) ao 26° dia foi feita a co-alimentação com dieta inerte. Foram utilizadas nove dietas inertes com ~56% de umidade, contendo três diferentes níveis de cálcio (0,35; 1,00 e 1,90%) e três de fósforo (0,70; 1,50 e 2,30%). Como fonte de cálcio foi usado cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e como fonte de fósforo o fosfato de Sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Também foram suplementadas fontes de potássio (KCl) e de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), em porcentagem fixas de 1,10 e 0,18%, respectivamente, em cada um dos tratamentos.

Tabela 1. Tabela de alimentação usada durante a larvicultura de *Macrobrachium rosenbergii*. Quantidades médias de cistos de *Artemia* utilizados para cada uma das nove dietas experimentais.

Dias de cultivo	Estágios dominantes	Náuplios de <i>Artemia</i> /mL	Cistos de <i>Artemia</i> (g/día)
Povoamento	I	0,0	0
2	I-II	4,5	2,98
3	II-III	5,0	3,31
4	III	5,5	3,64
5	III-IV	5,5	3,64
6-7	IV-V	6,0	3,97
8	V	6,0	3,97
9-10	V-VI	6,0	3,97
11-12	VI-VII	7,0	4,63
13-14	VI-VII-VIII	8,0	5,29
15-18	VII-VIII-IX	9,0	5,95
19-21	VIII-IX	10,0	6,62
22-24	IX-X-XI	11,0	7,28
25-28	XI-PL	12,0	7,94

A taxa de eclosão média foi de 181.400 náuplios de *Artemia*/g de cistos

Todas as dietas formuladas foram isoprotéicas ( $38,8 \pm 0,3$  % de proteína bruta), isolipídicas ( $19,2 \pm 0,2\%$  de extrato etéreo) e isocalóricas ( $4.918 \pm 41$  kcal/kg de energia bruta). A formulação e composição proximal das dietas experimentais e dos náuplios de *Artemia* são apresentadas na Tabela 2. Os ingredientes secos foram pesados individualmente e misturados em micro-moinho (IKA modelo A11 Basic) e posteriormente combinados com os ingredientes úmidos em um liquidificador. A pasta homogênea resultante foi transferida para uma forma de alumínio e cozida em banho-maria por aproximadamente 30 minutos a uma temperatura máxima de 55°C. Após o resfriamento, as dietas foram divididas em porções suficientes para um dia de alimentação. Essas porções foram armazenadas em sacos plásticos a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Valenti et al., 1998). A quantidade diária fornecida ao longo da larvicultura variou da seguinte forma: 41,75 mg/L do 11° ao 12° dia, 50,0 mg/L do 13° ao 18° dia, 60 mg/L do 19° ao 21° dia e 70 mg/L do 22° ao 26° dia (Valenti et al., 1998). Estas quantidades foram divididas em três refeições ao longo do dia e ofertadas às 08h, 13h e 18h. Antes do fornecimento, as dietas passavam por peneiras de 250  $\mu\text{m}$  (11° e 12° dias), 425  $\mu\text{m}$  (13° ao 21° dia) e 710  $\mu\text{m}$  (22° ao 25° dia). Posteriormente eram distribuídas manualmente nos tanques correspondentes aos respectivos tratamentos. A cada dois dias, era realizada a sifonagem dos resíduos de alimento, fezes e larvas mortas.

Tabela 2. Formulação e composição proximal das dietas experimentais e dos náuplios de *Artemia* utilizados na larvicultura de *M. rosenbergii*.

Ingredientes base úmida (%)	0,35 % Ca			1,00 % Ca			1,90 % Ca			Náuplios <i>Artemia</i>
	0,70 % P	1,50 % P	40,09	0,70 % P	1,50 % P	40,09	0,70 % P	1,50 % P	40,09	
Clara de ovo de galinha	40,09	40,09	40,09	40,09	40,09	40,09	40,09	40,09	40,09	40,09
Gema de ovo de galinha	17,40	17,40	17,40	17,40	17,40	17,40	17,40	17,40	17,40	17,40
Lula	13,66	13,66	13,66	13,66	13,66	13,66	13,66	13,66	13,66	13,66
Filé de tilápia	13,66	13,66	13,66	13,66	13,66	13,66	13,66	13,66	13,66	13,66
Leite em pó <sup>a</sup>	5,47	5,47	5,47	5,47	5,47	5,47	5,47	5,47	5,47	5,47
Farinha de trigo <sup>b</sup>	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73	2,73
Emulsão de Scott <sup>c</sup>	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Suplemento vitamínico-mineral <sup>d</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Vitamina C <sup>e</sup>	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
<b>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O<sup>f</sup></b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>2,00</b>	<b>2,00</b>	<b>2,00</b>	<b>2,00</b>
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>g</sup></b>	<b>0,00</b>	<b>1,00</b>	<b>2,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,00</b>	<b>2,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,00</b>	<b>2,00</b>	<b>2,00</b>
KCl <sup>h</sup>	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O <sup>i</sup>	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
SiO <sub>2</sub> <sup>j</sup>	4,00	3,00	2,00	3,00	2,00	1,00	2,00	1,00	2,00	0,00
TOTAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
(%) de umidade	56,40	56,41	56,41	56,40	56,40	56,40	56,39	56,39	56,40	56,40

**Composição analisada (100% MS)**

Proteína bruta	38,6 ± 0,1	38,8 ± 0,1	38,4 ± 0,1	38,2 ± 0,1	38,0 ± 0,1	38,3 ± 0,1	38,1 ± 0,1	37,9 ± 0,1	38,0 ± 0,1	38,0 ± 0,1	57,5 ± 0,2
Extrato etéreo	19,9 ± 0,1	20,0 ± 0,1	19,8 ± 0,1	19,6 ± 0,1	19,5 ± 0,1	19,8 ± 0,1	19,7 ± 0,1	19,6 ± 0,1	19,4 ± 0,1	19,4 ± 0,1	16,21 ± 0,04
Fibra bruta	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	2,86 ± 0,2
Matéria mineral	18,5 ± 0,2	16,6 ± 0,2	18,0 ± 0,2	18,0 ± 0,2	16,6 ± 0,2	16,7 ± 0,2	17,2 ± 0,2	16,0 ± 0,2	14,3 ± 0,2	14,3 ± 0,2	10,06 ± 0,3
Extrato não nitrogenado	22,3 ± 0,5	23,8 ± 0,5	23,2 ± 0,5	23,4 ± 0,5	25,3 ± 0,5	24,6 ± 0,5	24,3 ± 0,5	25,8 ± 0,5	27,6 ± 0,5	27,6 ± 0,5	13,37 ± 0,7
<b>Cálcio total</b>	<b>0,34 ± 0,01</b>	<b>0,35 ± 0,03</b>	<b>0,32 ± 0,01</b>	<b>1,03 ± 0,01</b>	<b>1,13 ± 0,03</b>	<b>1,04 ± 0,01</b>	<b>1,88 ± 0,03</b>	<b>1,91 ± 0,03</b>	<b>1,83 ± 0,03</b>	<b>1,83 ± 0,03</b>	<b>0,01 ± 0,00</b>
<b>Fósforo total</b>	<b>0,70 ± 0,01</b>	<b>1,50 ± 0,02</b>	<b>2,37 ± 0,03</b>	<b>0,70 ± 0,01</b>	<b>1,50 ± 0,02</b>	<b>2,28 ± 0,02</b>	<b>0,73 ± 0,01</b>	<b>1,47 ± 0,02</b>	<b>2,31 ± 0,02</b>	<b>2,31 ± 0,02</b>	<b>1,34 ± 0,02</b>
Relação Ca:P	0,49:1	0,23:1	0,14:1	1,47:1	0,75:1	0,46:1	2,58:1	1,30:1	0,79:1	0,79:1	0,01:1
Energia bruta (kcal/kg)	4,973	4,977	4,952	4,897	4,869	4,915	4,902	4,898	4,871	4,871	4,760
Relação energia:proteína(kcal/g)	12,9:1,0	12,8:1,0	12,9:1,0	12,8:1,0	12,8:1,0	12,8:1,0	12,9:1,0	12,9:1,0	12,8:1,0	12,8:1,0	8,3:1,0

<sup>a</sup>Nestlé<sup>®</sup>: composição em (100g): K 1,26g; Ca 0,97g; P 0,72g; Na 0,33g; Mg 0,08g; ácido pantotênico 2,77mg; riboflavina 1,38 mg; cobalamina 2,62µg. <sup>b</sup>Nita<sup>®</sup>: composição em (100g): Ca 18mg; Ferro 1,2 mg. <sup>c</sup>Emulsão de Scott<sup>®</sup>: composição em (100g): óleo de fígado de bacalhau 5,88g (EPA:18%, DHA:12%), óleo de soja 20,60g (ácido linoléico 53%, ácido oléico 25%, ácido palmítico 11%, ácido linolênico 7% e ácido esteárico 4%), fosfato monossódico anidro (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,22g; fosfato dicálcico (CaHPO<sub>4</sub>) 0,54g; hipofosfito de sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O) 0,40g; palmitato de retinol 25,300 U.I.; Colecalciferol 2,530 U.I. <sup>d</sup>Suplemento vitamínico-mineral Frit-Ribe (mg/100 g): vitamina B<sub>1</sub> 3,0; vitamina B<sub>2</sub> 2,5; vitamina B<sub>6</sub> 3,5; vitamina B<sub>12</sub> 4,0; vitamina C 15,0; vitamina E 15,0; vitamina K 0,3; vitamina A 1000,0 IU; vitamina D 300,0 UI; ácido fólico 0,4; ácido pantotênico 5,0; Colina 40,0; Biotina 0,1; Niacina 10,0; Zn 15,0; Cu 5,0; Mn 4,0; Fe 2,0; I 0,15; Cr 0,06; Co 0,03; Se 0,03; antioxidante 10,0. <sup>e</sup>Vit. C (ácido L-ascórbico-2-poli-fosfato). <sup>f</sup>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (JT Baker); <sup>g</sup>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth); <sup>h</sup>KCl (JT Baker); <sup>i</sup>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Mallinckrodt, Chemicals); <sup>j</sup>SiO<sub>2</sub> (Celite<sup>®</sup>).

## 2.3 Composição química

A composição química centesimal das dietas experimentais e dos náuplios de *Artemia* foi determinada conforme a metodologia descrita pela AOAC (1998). O teor de matéria seca (MS) foi determinado, submetendo as amostras à secagem em estufa a 105°C por 16 horas. O teor de proteína bruta (PB) foi calculado pelo conteúdo de nitrogênio total, determinado pelo método de Kjeldahl e multiplicado pelo fator 6,25. O extrato etéreo (EE) foi analisado após extração em (Soxhlet), tendo como solvente o éter de petróleo (ponto de ebulição 30 – 60°C), com refluxo contínuo através da amostra, durante 5 horas. O conteúdo de fibra bruta (FB) foi obtido a partir das amostras secas e desengorduradas, submetidas à digestão ácida ( $H_2SO_4$  – 1,25%) e básica (NaOH – 1,25%) durante 30 minutos por digestão, e posterior queima do resíduo em mufla, a 500 °C. A concentração de matéria mineral (MM) foi determinada carbonizando as amostras em mufla a 600°C por 3 horas. O teor de extrativo não nitrogenado (ENN) foi obtido subtraindo de cem por cento da matéria seca o total de nutrientes analisados. A determinação da energia bruta (EB) foi realizada em bomba calorimétrica de Parr (modelo 1281). Todas as análises foram realizadas em triplicata, com exceção da energia bruta (EB), a qual foi determinada em uma única análise.

### 2.3.1 Preparo da solução mineral

Para o preparo da solução mineral foram colocados 200 mg de amostra pré-seca (ração, náuplios de *Artemia* ou carcaça de PL) em tubos de ensaio de 100 mL, aos quais foram adicionados 4 mL de ácido nítrico ( $HNO_3$ ) (90%), deixando as amostras com o ácido em repouso por 30 min. Posteriormente os tubos foram aquecidos em chapa quente até atingirem temperatura de 200°C. Quando a solução adquiriu a cor amarelo-clara e o ácido ficou reduzido à metade, o aquecimento foi desligado. Após resfriamento fora adicionado cautelosamente 1 mL de ácido perclórico ( $HClO_4$ ) 70-72% e os tubos foram submetidos novamente a aquecimento até que a solução se tornou clara e cessou o desprendimento de vapor de coloração marrom, ponto no qual o aquecimento foi novamente desligado. Após os tubos esfriarem, a solução foi filtrada (filtro Whatman nº 40, S&S 589/2) e diluída com água destilada em balões volumétricos de 50 mL (AOAC, 1998).

### 2.3.1.1 Determinação do Cálcio inorgânico total

O conteúdo de cálcio nas dietas experimentais, da carcaça das pós-larvas e dos náuplios de *Artemia* foi analisado a partir de amostras aquosas de solução mineral. Determinou-se o teor do cátion cálcio por espectrofotometria de absorção atômica, aparelho (GBC modelo 932AA). A leitura no espectrofotômetro foi realizada em comprimento de onda de 422,7 nm, ajustando para 0% de absorbância (100% de transmitância), utilizando o branco (AOAC, 1998).

### 2.3.1.2 Determinação do Fósforo inorgânico total

O conteúdo de fósforo das dietas, da carcaça das pós-larvas e dos náuplios de *Artemia* foi analisado a partir de amostras aquosas de solução mineral. O teor do fósforo total (Fiske e Subbarow, 1925) foi determinado em espectrofotômetro visível (Pharmacia Biotech – ULTROSPEC 2000). A leitura no espectrofotômetro foi realizada em comprimento de onda de 725 nm, ajustando para 0% de absorbância (100% de transmitância), utilizando o branco (AOAC, 1998). Na ausência de dados para *M. rosenbergii*, o fósforo disponível estimado (FDE) foi calculado utilizando os valores obtidos para *Litopenaeus vannamei*, 86,3% para a dieta basal (Davis et al., 1993) e 68,2% para  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Davis e Arnold, 1994). O fósforo disponível estimado das dietas-teste utilizadas é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Níveis de suplementação de Ca e P e fósforo disponível estimado das dietas-teste utilizadas durante a fase larval do *Macrobrachium rosenbergii*.

Cálcio suplementado (% na dieta)	Fósforo suplementado (% na dieta)	% P total (analisado)	<sup>a</sup> FDE
0	0	0,70 ± 0,01	0,60
	1	1,50 ± 0,02	1,15
	2	2,37 ± 0,03	1,74
1	0	0,70 ± 0,01	0,60
	1	1,50 ± 0,02	1,15
	2	2,28 ± 0,02	1,68
2	0	0,73 ± 0,01	0,63
	1	1,47 ± 0,02	1,13
	2	2,31 ± 0,02	1,71

<sup>a</sup>Fósforo Disponível Estimado (dieta basal: 86,3% e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 68,2%). Valores médios ± desvio padrão para duas determinações

## 2.4 Variáveis de produção na larvicultura

O final da larvicultura ocorreu no 27º dia, quando aproximadamente 90% das larvas dos melhores tratamentos metamorfosearam-se em pós-larvas (PL). Os tanques larvicultura foram esvaziados e as larvas e pós-larvas (PL) coletadas e contadas individualmente. Foram determinadas as seguintes variáveis de produção: porcentagem de sobrevivência total, porcentagem de larvas e pós-larvas (% PL), peso seco final, biomassa de PL e produtividade (PL L<sup>-1</sup>). Para determinar o peso seco final, 50 PL de cada tanque foram lavadas em água destilada, secas em papel de filtro e transferidas para cartuchos de papel alumínio previamente pesados (5 PL/cartucho). Os cartuchos foram levados à estufa com sistema de circulação (Nova Ética) mantendo a temperatura em 55°C, por 48 h. Logo após, os cartuchos foram transferidos para um dessecador e, após duas horas, pesados em balança analítica (Mettler Toledo AT21, precisão de 1 µg). A biomassa em pós-larvas foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Biomassa em PL (g)} = (\text{n}^\circ \text{ de PL final} \times \text{peso seco final médio (mg)}) / 1000;$$

### 2.4.1. Índice de estágio larval (IEL)

Para a avaliação do efeito dos níveis de cálcio e fósforo no desenvolvimento larval, amostras de 10 larvas de cada tanque de larvicultura foram examinadas a cada três dias sob microscópio invertido (Olympus CKX41) para observação do estágio larval. O índice de estágio larval (IEL) foi determinado de acordo com o método da média ponderada de Manzi et al. (1977) segundo a fórmula:

$$\text{IEL} = \frac{\sum ni.E}{n}$$

Sendo:

ni = nº de larvas no estágio E;

E = estágio de desenvolvimento variando de I a XI;

n = nº de unidades da amostra.

Os doze estágios larvais foram identificados segundo as descrições de Uno e Kwon (1969). As pós-larvas recém metamorfoseadas (estágio XII), não foram consideradas para os cálculos do índice de estágio larval (IEL).

#### 2.4.2. Índice de condição larval (ICL)

O índice de condição larval foi verificado seguindo a planilha desenvolvida por Tayamen e Brown (1998) para *M. rosenbergii*. Os itens analisados foram: condições do intestino, condições do hepatopâncreas, estado dos cromatóforos, coloração do corpo, estado do rostro e cerdas, proporção da musculatura em relação ao intestino, aparência do músculo do abdome, melanização e presença de organismos infestantes. O índice de condição larval (ICL) foi determinado de acordo com a fórmula:

$$IC = \frac{\sum P}{10n}$$

Sendo P = total de pontos; n = n° da amostra.

#### 2.5. Delineamento experimental e análise dos dados

Utilizou-se um delineamento em blocos casualizados temporais, em esquema fatorial 3x3, correspondentes a três níveis de cálcio (0,35; 1,00 e 1,90%) e três de fósforo (0,70; 1,50 e 2,30%), com três repetições cada. Os valores expressos em porcentagens foram previamente transformados em arco seno  $\sqrt{x/100}$ . As seguintes variáveis de produção foram submetidas à Análise de Variância: % de sobrevivência total, % de larvas, % de pós-larvas, peso seco final (mg), biomassa em pós-larvas (g), produtividade (PL L<sup>-1</sup>) e os índices de estágio larval e condição larval que foram avaliados no dia anterior à despesca. Os dados foram submetidos à análise da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e de homocedasticidade pelo teste Brown-Forsythe. Como as variáveis não se afastaram significativamente dessas premissas, as médias foram submetidas à ANOVA pelo teste F. Quando foram verificadas diferenças entre tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey e as interações por mínimos quadrados (LSM – “Least Squares Means”). Consideraram-se médias diferentes quando P<0,05. As análises estatísticas foram realizadas no “Statistical Analysis System” (SAS Institute Inc., version 9.0).

### 3. RESULTADOS

A sobrevivência variou entre 40,4 e 63,8% e não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 4). As análises de variância mostraram interação significativa entre Ca e P para as variáveis: porcentagem de larvas, peso seco, índice de estágio larval, índice de condição larval, biomassa em pós-larvas e porcentagem de Ca e P na carcaça das pós-larvas. A porcentagem de larvas foi maior e o índice de estágio larval foi menor na dieta com níveis de 1,90% Ca e 2,30% P total (1,71 % de P disponível) e diferiu significativamente das outras dietas ( $P < 0,01$ ). O índice de condição larval foi menor nos tratamentos com níveis de 1,90% Ca em combinação com 0,70 ou 1,50% P. O peso seco das pós-larvas de *M. rosenbergii* no dia da despesca variou entre 1,6 e 2,2 mg.

De maneira geral, as dietas com combinações entre níveis de (1,00% Ca e 1,50% P; 1,00% Ca e 2,30% P e 1,90% Ca e 2,30% P) proporcionaram peso seco significativamente menor, quando comparadas com as outras combinações (Tabela 4). A porcentagem de pós-larvas (% PL) e a produtividade ( $PL L^{-1}$ ) não apresentaram interação significativa entre Ca e P ( $P > 0,05$ ). Entretanto, houve efeitos isolados para os fatores Ca e P, nestes parâmetros. A porcentagem de PL e a produtividade foram significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) nas larvas alimentadas com níveis de 0,35 ou 1,00% de Ca na dieta, independentemente do nível de fósforo, ou com 1,50% de P, independentemente do nível de Ca.

Na figura 1 observa-se que as maiores biomassas em pós-larvas foram obtidas nas dietas com níveis de 0,35% de Ca e 1,50% de P (1,15 % de P disponível). A porcentagem de Ca na carcaça das pós-larvas foi significativamente mais elevada ( $P < 0,05$ ) quando a dieta continha níveis de 1,00% de Ca e 2,30% de P (Figura 2). Por outro lado, larvas alimentadas com dietas com 0,70 ou 1,50% de P em combinação com 1,00% de Ca, apresentaram os valores mais elevados de P na carcaça (Figura 3).

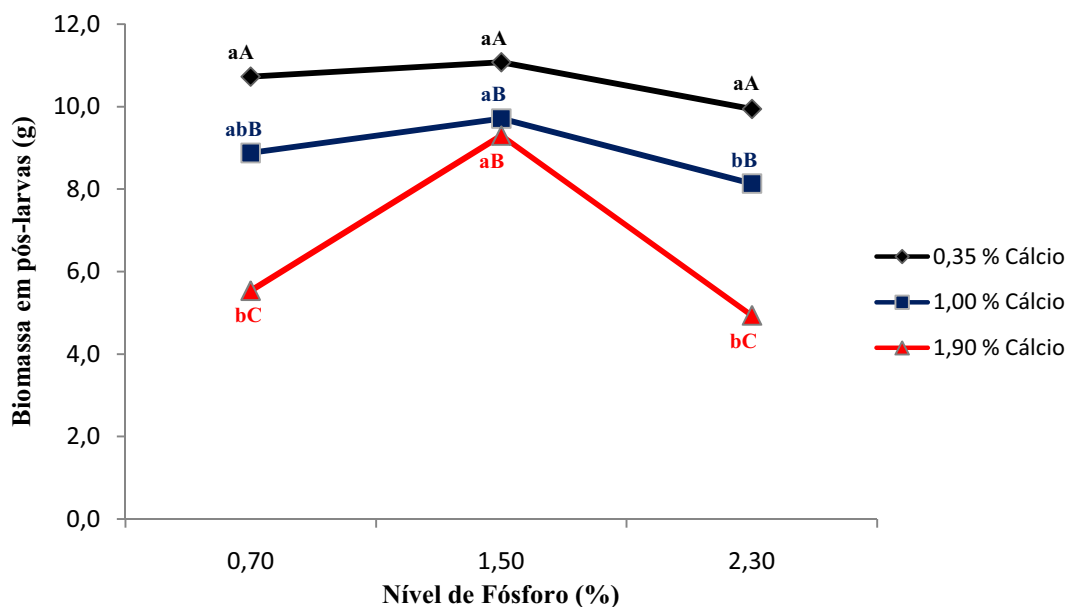


Figura 1. Valores médios de biomassa final em pós-larvas de *M. rosenbergii*, no desdobramento da interação entre três níveis de P e três níveis de Ca fornecidos na dieta. Médias seguidas das mesmas letras (maiúscula para vertical e minúscula para horizontal) não diferem pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

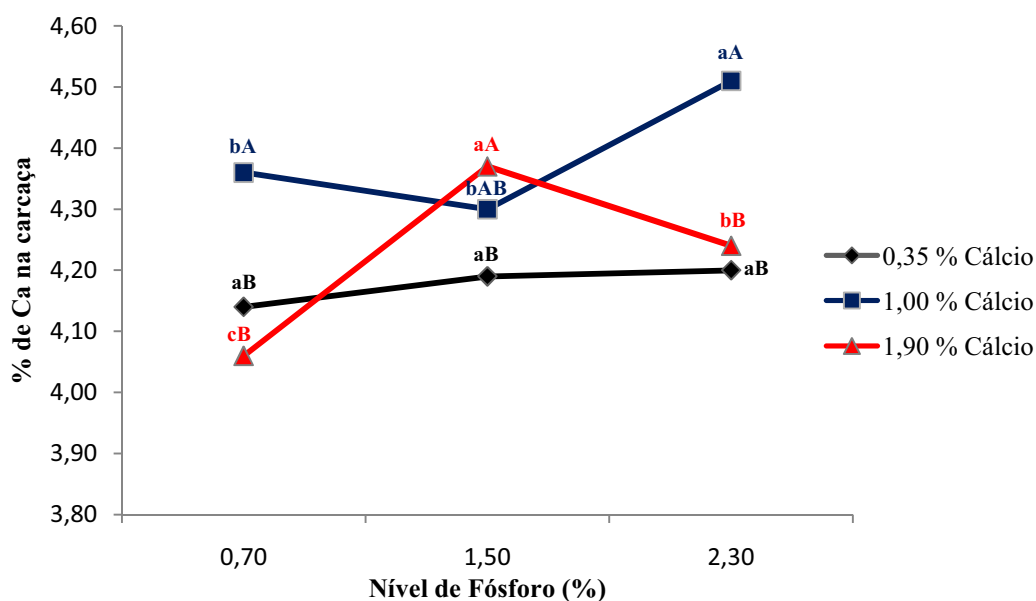


Figura 2. Conteúdo médio de cálcio na carcaça de pós-larvas de *M. rosenbergii*, no desdobramento da interação entre três níveis de P e três níveis de Ca fornecidos na dieta. Médias seguidas das mesmas letras (maiúscula para vertical e minúscula para horizontal) não diferem pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Tabela 4. Efeito de diferentes níveis de cálcio e fósforo na dieta sobre a sobrevivência, a porcentagem de larvas, a produtividade, o peso seco, o índice de estágio larval (IEL) e o índice de condição larval (ICL) em pós-larvas de *M. rosenbergii*.

Cálcio (%)	Fósforo (%)	Sobrevivência (%)	Larvas (%)	Produtividade (PL L <sup>-1</sup> )	Peso seco (mg)	<sup>1</sup> IEL	<sup>1</sup> ICL
	0,70	57,7 ± 4,7	3,5 ± 2,9 b	43,4 ± 4,0	2,1 ± 0,3 ab	11,6 ± 0,1 a	1,8 ± 0,0 b
0,35	1,50	64,0 ± 2,6	4,7 ± 2,0 b	47,4 ± 1,5	2,0 ± 0,2 ab	11,5 ± 0,1 a	1,9 ± 0,0 a
	2,30	58,6 ± 2,6	4,1 ± 3,7 b	43,6 ± 3,3	1,9 ± 0,2 bc	11,5 ± 0,1 a	1,8 ± 0,1 b
	0,70	52,0 ± 7,1	3,4 ± 2,4 b	38,9 ± 6,5	1,9 ± 0,2 bc	11,6 ± 0,1 a	1,8 ± 0,0 b
1,00	1,50	62,5 ± 5,5	3,2 ± 0,6 b	47,4 ± 4,0	1,7 ± 0,2 cd	11,6 ± 0,2 a	1,9 ± 0,0 a
	2,30	55,7 ± 13,0	4,3 ± 4,4 b	41,2 ± 7,3	1,6 ± 0,2 d	11,5 ± 0,2 a	1,8 ± 0,0 b
	0,70	36,8 ± 12,1	5,5 ± 5,5 b	25,0 ± 5,3	1,9 ± 0,2 bc	11,2 ± 0,2 a	1,6 ± 0,0 c
1,90	1,50	46,8 ± 10,2	1,2 ± 0,5 b	36,5 ± 7,8	2,1 ± 0,3 a	11,7 ± 0,1 a	1,6 ± 0,0 c
	2,30	52,0 ± 9,5	19,7 ± 4,0 a	25,9 ± 8,1	1,6 ± 0,4 d	10,5 ± 0,1 b	1,8 ± 0,1 b
Médias para Ca							
0,35		60,1 ± 4,2 a		44,8 ± 3,3 a			
1,00		56,8 ± 9,2 a		42,5 ± 6,5 a			
1,90		45,2 ± 11,4 b		29,1 ± 8,3 b			
Médias para P							
0,70		48,8 ± 11,9		35,8 ± 9,5 b			
1,50		57,8 ± 10,2		43,8 ± 7,1 a			
2,30		55,5 ± 8,7		36,9 ± 10,1 b			
ANOVA (P > F)							
Ca		*	NS	*	*	NS	NS
P		NS	**	**	*	NS	NS
Interação Ca x P		NS	*	NS	*	*	*

<sup>1</sup> Avaliados um dia antes da despesca. Valores médios (± desvio padrão) para três determinações. Médias seguidas das mesmas letras na mesma coluna não diferem pelo teste de Tukey. \* - Altamente significativo (P < 0,01); \*\* - Significativo (P < 0,05); NS - Não significativo (P > 0,05).

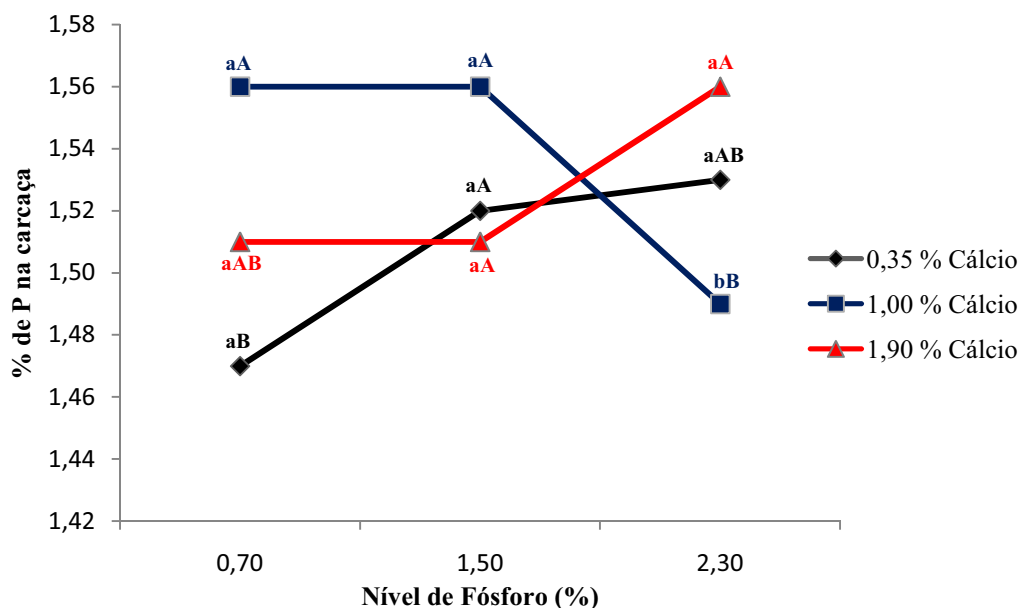


Figura 3. Conteúdo médio de fósforo na carcaça de pós-larvas de *M. rosenbergii*, no desdobramento da interação entre três níveis de P e três níveis de Ca fornecidos na dieta. Médias seguidas das mesmas letras (maiúscula para vertical e minúscula para horizontal) não diferem pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ).

### 3.1 Cálcio e fósforo na água

Altas concentrações de Ca na água ao final da larvicultura foram registradas nos tratamentos que receberam 0,35 e 1,00% de Ca na dieta e diferiram significativamente das que receberam 1,90% de Ca, com exceção da combinação com 1,50% de P, onde não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) (Figura 4). As concentrações de P na água (Figura 5) apresentaram aumento significativo ( $P<0,05$ ) para cada incremento no nível P, atingindo os maiores valores no nível de 2,30% de P em combinação com 1,00 ou 1,90% de Ca na dieta. Assim, níveis de 1,90% de Ca na dieta diminuíram as concentrações de Ca na água dos taques de larvicultura e níveis de 1,00% de Ca na dieta aumentaram as concentrações de P.

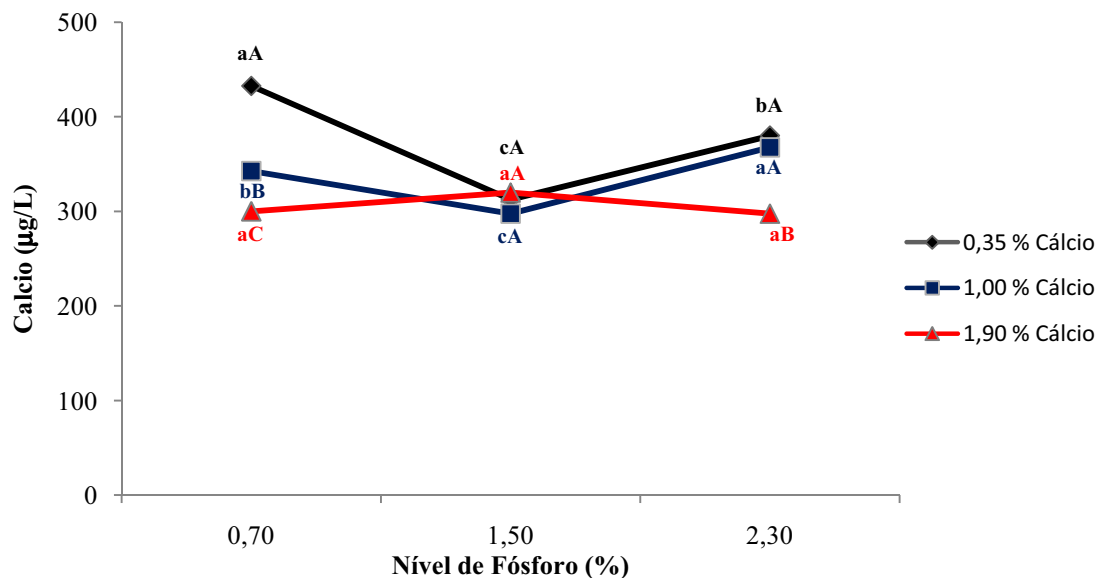


Figura 4. Valores médios de concentração de cálcio na água no desdobramento da interação entre três níveis de P e três níveis de Ca fornecidos na dieta de larvas de *M. rosenbergii*. Médias seguidas das mesmas letras (maiúscula para vertical e minúscula para horizontal) não diferem pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

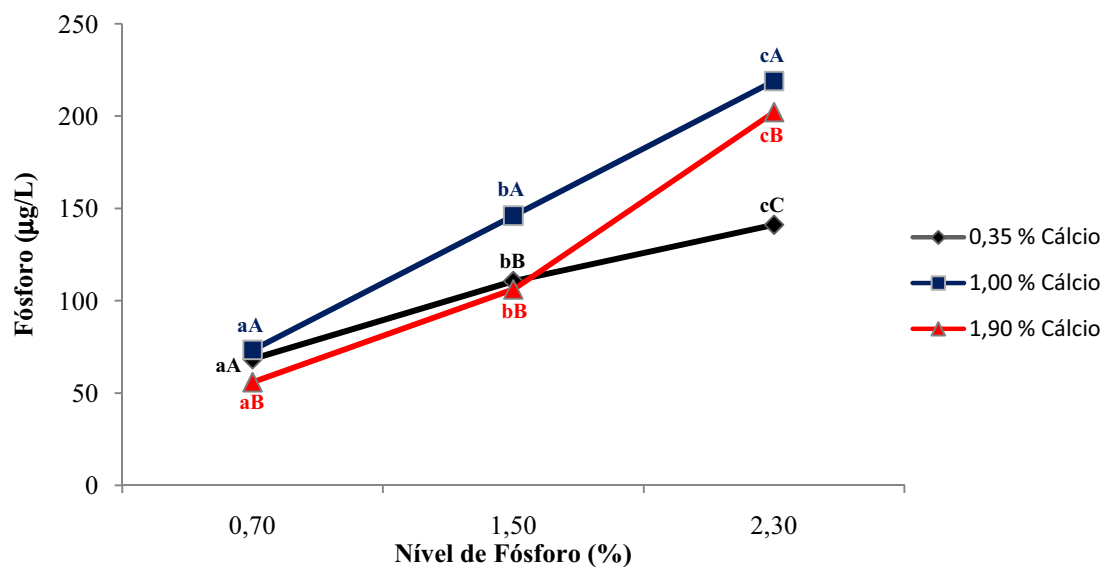


Figura 5. Valores médios de concentração de fósforo na água no desdobramento da interação entre três níveis de P e três níveis de Ca fornecidos na dieta de larvas de *M. rosenbergii*. Médias seguidas das mesmas letras (maiúscula para vertical e minúscula para horizontal) não diferem pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

A sobrevivência total das larvas de *M. rosenbergii* não foi influenciada pela interação entre Ca e P. No entanto, houve efeito isolado para o fator Ca, indicando que a suplementação com 0 ou 1% de Ca na dieta, independentemente da suplementação com P, aumenta as taxas de sobrevivência. Peñaflorida (1999) e Cheng et al. (2006) testando a interação entre níveis de Ca e P em juvenis de *Penaeus monodon* e *Litopenaeus vannamei*, também não encontraram interação significativa para a variável sobrevivência. No entanto, Cheng et al. (2006) encontraram também efeito isolado para o fator Ca. .

De forma similar, a porcentagem de pós-larvas (% PL) e a produtividade (PL L<sup>-1</sup>) também não apresentaram interação significativa entre Ca e P (P>0,05). Contudo, foram registrados efeitos isolados para os fatores Ca e P, nestes parâmetros. Larvas com suplementação dietética de 0 ou 1% de Ca, independentemente da suplementação com P, ou suplementadas com 1% de P, independentemente do nível dietético de Ca, tiveram a maior porcentagem de pós-larvas e produtividade (PL L<sup>-1</sup>). A dieta suplementada com 2% de Ca e 2% de P retardou a metamorfose, aumentando a porcentagem de larvas ao final da larvicultura, fato evidenciado pelo menor índice de estágio larval (IEL), quando comparado com as demais dietas.

Em relação ao peso seco das pós-larvas de *M. rosenbergii* houve interação significativa entre Ca e P, similar a resultados obtidos por Davis et al. (1993) com *Litopenaeus vannamei*. As larvas alimentadas com dietas suplementadas com 1%Ca 1%P, 1%Ca 2%P e 2%Ca 2%P e relações Ca/P 0,75:1; 0,45:1 e 0,79:1, respectivamente, alcançaram menores valores de peso seco (Tabela 4). No entanto, estes resultados não explicaram por que relações dietéticas de Ca/P similares apresentaram valores significativamente maiores de peso seco, como aconteceu nos tratamentos com 0%Ca 0%P (0,48:1) e 2%Ca 2%P (0,79:1). Assim, não é possível afirmar que houve uma relação Ca/P ideal, pois tratamentos com similar relação apresentaram respostas diferentes nas outras variáveis de desempenho produtivo analisadas. De maneira similar, não foram encontradas relações dietéticas Ca/P ideais para outras espécies, tais como: *Litopenaeus vannamei* (Davis et al., 1993), *Penaeus monodon* (Peñaflorida, 1999) e algumas espécies aquáticas (Coote et al., 1996; Chavez-Sanchez et al., 2000). Ambasankar e Ali (2002) relataram bom desempenho produtivo em juvenis do camarão

branco Indiano *Penaeus indicus*, quando estes foram alimentados com dietas suplementadas com 1% de P total e uma relação Ca/P de 1,25:1.

A excessiva suplementação com Ca na dieta aumentou a porcentagem de larvas, diminuiu a sobrevivência total, a porcentagem de pós-larvas e a produtividade (PL L<sup>-1</sup>). As dietas suplementadas com 2% de Ca levaram a baixa sobrevivência e produtividade. Estes resultados concordam com outros experimentos realizados com juvenis de camarões marinhos (Davis et al., 1993; Peñaflorida, 1999, Cheng et al., 2006). Por outro lado, altos níveis de Ca na dieta podem resultar em inibição da absorção de P e outros nutrientes em peixes (Nakamura, 1982) e crustáceos (Davis et al., 1993; Peñaflorida, 1999) diminuindo o crescimento (Pan et al., 2005). Excessiva suplementação com Ca também pode resultar em incrementos nas exigências de fósforo pelos camarões, o que leva a um incremento dos custos do alimento e no descarte de minerais para o ambiente (Cheng et al., 2006).

A dieta suplementada com 2% Ca e 2% P, 2,31% de P total (1,71 de P disponível) diminuiu o índice de estágio larval ( $9,5 \pm 0,1$ ), aumentando a porcentagem de larvas ( $19,7 \pm 0,4\%$ ) ao final da larvicultura, o que evidenciou que esta combinação atrasou o processo de muda. Tanto a porcentagem de larvas quanto o índice de estágio larval, foram afetados pela interação significativa entre Ca e P, sendo que o tratamento suplementado com 2% Ca e 2% P diferiu significativamente dos outros. O atraso no desenvolvimento larval possivelmente pode ter acontecido por um aumento nas concentrações de cálcio na hemolinfa, no hepatopâncreas e no gastrólito das larvas, o qual finalmente dificultou o processo de ecdise ou muda. As dietas suplementadas com 2% de Ca em combinação com 0 ou 1% de P tiveram menores índices de condição larval, o que possivelmente evidenciou efeitos destas dietas sobre alguns parâmetros avaliados por este índice.

Por outro lado, altos níveis de P na dieta suprimiram o crescimento do camarão Indiano *Penaeus indicus* (Ambasankar e Ali, 2002). Neste estudo, observou-se comportamento semelhante, evidenciado pelo baixo peso das pós-larvas de *M. rosenbergii*, nas dietas suplementadas com maior quantidade de P. No entanto, a diminuição do crescimento das PL pode ter resultado da combinação de altos níveis de Ca com altos níveis de P. Esta redução no crescimento dos camarões em função de altos níveis de P dietético também foi observada em juvenis de camarões marinhos, tais como

*P. monodon* (Peñaflorida, 1999) e *L. vannamei* (Cheng, et. al., 2006). Cheng et al., (2006) relataram que, com baixa concentração de Ca na água e baixa salinidade 0,063 µg/L e 2‰, respectivamente, dietas contendo 0,93% de P total (0,77% de fósforo disponível estimado - FDE), e 0,5% de Ca total e uma relação Ca/P de 0,54:1, foram adequadas para ótimo crescimento. Estes mesmos autores também descreveram que na presença de 1% de suplementação de Ca, os juvenis de *L. vannamei* alimentados com dietas contendo 2% do P total (1,22% FDE) e relação Ca/P de 0,50:1, tiveram melhor desempenho em crescimento, indicando que a resposta à suplementação de P na dieta foi dependente do nível de Ca na mesma.

Em *Penaeus chinensis*, uma correlação positiva entre o nível de fósforo dietético e o conteúdo de fósforo do exoesqueleto foi reportada por Ren e Li (1996). Huang et al. (2004) alimentaram juvenis de *L. vannamei* em baixa salinidade, e reportaram correlação negativa entre a taxa de crescimento específica e a relação Ca/P do músculo. Por outro lado, os resultados de Pan et al (2005) sugerem que o conteúdo de cinzas cálcio e fósforo na carcaça, assim como o conteúdo de Ca e P no exoesqueleto são bons critérios para estimar a utilização do fósforo em *L. vannamei*.

Assim, a maior porcentagem de Ca na carcaça das pós-larvas de *M. rosenbergii* foi verificada na dieta suplementada com 1% de Ca e 2% de P. Por outro lado, na dieta suplementada com 0 ou 1% de P em combinação com 1% de Ca, foi verificada a maior porcentagem de P na carcaça.

Os náuplios de *Artemia* não são uma boa fonte de cálcio para as larvas (~0,01%). No entanto, apresentam 1,34% de fósforo total (Tabela 4). Desta forma a relação Ca/P dos náuplios de *Artemia* fica reduzida a 0,01:1, o que não representa a relação Ca/P da carcaça das larvas de 2:80:1.

Em resumo larvas de *M. rosenbergii* alimentadas com uma dieta basal (0,35 % de Ca total) ou suplementadas com 1,0% de Ca, em combinação com 1,50 % de P total melhoram significativamente o desempenho em termos de produtividade ao final da larvicultura. Por conseguinte, recomenda-se a não suplementação com Ca na dieta e a suplementação com um de 1% de P que, somado ao P proveniente da dieta basal, atinge aproximadamente 1,50% de P total (~ 1,15% de P disponível). A inclusão de 1% de P na forma de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e unicamente o Ca proveniente da dieta basal (0,35%) são adequados para melhorar o desempenho produtivo desta espécie.

## 5. AGRADECIMENTOS

Às relações bilaterais entre o governo da Republica Federativa do Brasil e da Republica da Colômbia, sob amparo do Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG-CAPES) pela bolsa de doutorado concedida para o primeiro autor, processo nº 0078042. Ao programa de Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP pelo auxílio econômico concedido para o pagamento das análises de cálcio, fósforo e ácidos graxos das dietas e das pós-larvas (Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini).

## REFERENCIAS

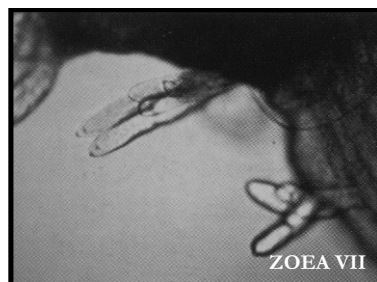
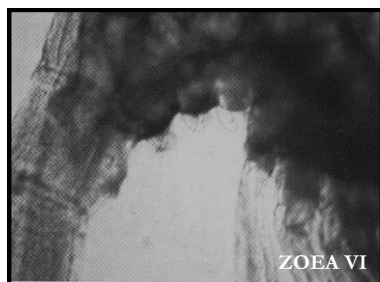
- AMBASANKAR, K., ALI, S.A. 2002. Effect of dietary phosphorus on growth and phosphorus excretion in Indian white shrimp. *Journal Aquatic Tropical*. 17, 119-126 pp.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION -APHA. 2005. Standard methods for the examination of water & wastewater. AWWA e WEF. 21 ed. Part. 2320, 2-27 p. Part. 4500-P, 4-416 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1998. Official Methods of Analysis of the AOAC International, 16th edition. AOAC International, Gaithersburg, M.D., USA.
- CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161-180 p.
- CHAVEZ-SANCHEZ, C., MARTINEZ-PALACIOS, C.A., MARTINEZ-PEREZ, G., ROSS, L.G. 2000. Phosphorus and calcium requirement in the diet of the American cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther). *Aquaculture Nutrition* 6, 1-9 p.
- CHENG, K., HU, C., LIU, Y., ZHENG, S., QI, X. 2006. Effects of dietary calcium, phosphorus and calcium/phosphorus and tissue mineralization of *Litopenaeus vannamei* reared in low-salinity water. *Aquaculture* 251. 472-483 p.
- COOTE, T.A., HONE, P.W., KENYON, R., MAGUIRE, G.B. 1996. The effect of different combinations of dietary calcium and phosphorus on the growth of juvenile *Haliotis laevigata*. *Aquaculture* 145. 267-279 p.
- DAVIS, D.A., ARNOLD, C.R. 1994. Estimation of apparent phosphorus availability from inorganic phosphorus sources for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 127. 245-254.
- DAVIS, D.A., LAWRENCE, A.L., GATLIN, D.M. 1993. Response of *Penaeus vannamei* to dietary calcium, phosphorus and calcium: phosphorus ratio. *Journal of the World Aquaculture Society* 24. 504-515 p.
- DESHIMARU, O., YONE, Y. 1978. Requirement prawn for dietary minerals. *Nippon Suisan Gakkaishi* 44, 907-910 p.
- FISKE, C.A., SUBBAROW, I. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal Biochemistry*, v. 66. 375 p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. 2009. Yearbook of fishery statistics: summary tables. Roma. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/fi/STAT/summary/default.htm#aqua> Acesso em: 11 de janeiro de 2009.

- HUANG, K.; WU, W.; KONG, L.F.; HUANG, H.H. 2004. Requirements of *Penaeus vannamei* in low salinity water for dietary phosphorus and calcium. *J. Ocean Univ. China* 34 (2), 209-216.
- HUNG, L.T., TUAN, N.A., CACOT, P., LAZARD, J. 2002. Larval rearing of Asian catfish, *Pangasius bocourti* (Siluroidei, Pangasiidae): alternative feeds and weaning time. *Aquaculture* 212, 115 – 127 p.
- KANAZAWA, A.; TESHIMA, S.; SASAKI, M. 1984. Requirements of the juvenile prawn for calcium, phosphorus, magnesium, potassium, copper, manganese and iron. *Men. Fac. Fish., Kagoshima University* 33. 63-71 p.
- LAVENS, P., THONGROD, S., SORGELOOS, P. 2000. Larval prawn feeds and the dietary importance of *Artemia*. In: New, M.B., Valenti, W.C. (Eds.), *Freshwater Prawn Culture: The farming of *Macrobrachium rosenbergii**. Blackwell Science Ltd. Oxford-United Kingdom. 91-111 p.
- MALLASEN, M., VALENTI, W.C. 2008. Criação de camarão-de-água-doce. Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão (Funep). Jaboticabal, SP. 45 p.
- MANZI, J.J., MADDOX, M.B., SANDIFER, P.A., 1977. Algal supplement enhancement of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) larviculture. *Journal World Mariculture Society*, 8, 207-223 p.
- NAKAMURA, Y. 1982. Effects of dietary phosphorus and calcium contents on the absorption of phosphorus in the digestive tract of carp. *Bulletin Japanese Society Science Fisheries*. 48, 409-414 pp.
- PAN, Q., CHEN, X., LI, F., BI, Y., ZHENG, S. 2005. Response of juvenile *Litopenaeus vannamei* to varying levels of calcium phosphate monobasic supplement to a practical diet. *Aquaculture* 248. 97-102 p.
- PEÑAFLORES, V.D. 1999. Interaction between dietary of calcium and phosphorus on growth of juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 172. 281-289 p.
- REN, Z.L.; LI, A.J. 1996. Effect of dietary calcium and phosphorus levels on muscle and exoskeleton calcium and phosphorus contents in *Penaeus chinensis*. *China fed* 6, 29-30.
- TAYAMEN, M.; BROWN, J.H. 1998. A condition index for evaluating larval quality of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Aquaculture Research*, 30:917-922.
- UNO, Y., KWON, C.S. 1969. Larval development of *Macrobrachium rosenbergii* reared in the laboratory. *Journal of the Tokyo University Fisheries*. 55. 179-191 p.
- VALENTI, W.C. 1993. Freshwater prawn culture in Brazil. *World Aquaculture*. Baton Rouge, v.24, n.1, 29-34 p.
- VALENTI, W.C.; MALLASEN, M.; SILVA, C.A 1998. Larvicultura em sistema fechado dinâmico. In: *Carcinicultura de água doce: Tecnologia para produção de camarões*. IBAMA e FAPESP. Brasília. pp. Capítulo 6 pp 115-143.
- VALENTI, W.C.; DANIELS, W.H. 2000. Recirculation Hatchery Systems and Management. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C. (Eds.) *Freshwater prawn culture: The farming of *Macrobrachium rosenbergii**. Oxford, Blackwell Science. p. 69-90.

# CAPÍTULO 3

## Artigo 2

### NÍVEIS DIETÉTICOS DE LIPÍDEO PARA A LARVICULTURA DE *Macrobrachium rosenbergii*



FONTE DAS FOTOS: TAKUJI FUJIMURA

## NÍVEIS DIETÉTICOS DE LIPÍDEO PARA A LARVICULTURA DE *Macrobrachium rosenbergii*

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado<sup>1</sup>, Wagner Cotroni Valenti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista/CAUNESP – Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

### RESUMO

A formulação de uma dieta balanceada que atenda as exigências de lipídeos nas larvas de *Macrobrachium rosenbergii* é importante para garantir melhor produtividade ao final da larvicultura. Avaliou-se o efeito de diferentes níveis de lipídeo na dieta inerte sobre as principais variáveis de produção durante a larvicultura de *Macrobrachium rosenbergii*. Além disso, determinou-se o perfil de ácidos graxos na carcaça dos animais, nos náuplios de *Artemia* e nas diferentes dietas. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro tratamentos, correspondentes a quatro níveis de lipídeo (12, 16, 20 e 24%) e quatro repetições. Dois dias após a eclosão, as larvas passaram a ser alimentadas com quantidades crescentes de náuplios de *Artemia*. A partir do 11º dia (zoea VII), iniciou-se a co-alimentação, fornecendo-se as dietas-teste juntamente com os náuplios de *Artemia* até o final do ciclo de larvicultura. No 26º dia de cultivo, quando aproximadamente 90% das larvas metamorfosearam-se em pós-larvas (PL), realizou-se a despesca. Foi calculada a taxa de sobrevivência, a biomassa final de PL, a porcentagem de larvas e a produtividade (PL L<sup>-1</sup>) em cada tratamento. Observou-se que as larvas de *M. rosenbergii* alimentadas com dieta inerte contendo 16% de lipídeo melhoraram significativamente o número de pós-larvas produzidas por litro ao final da larvicultura. Pode-se concluir que 16% de lipídeo na dieta durante a larvicultura é o nível mais adequado para aumentar a produtividade desta espécie. No entanto, níveis menores poderiam ser usados se o perfil de ácidos graxos fosse otimizado.

**Palavras-chave:** camarão-da-malásia, larvicultura, lipídeo dietético

## DIETARY LEVELS OF LIPIDS IN THE LARVAL PHASE OF *Macrobrachium rosenbergii*

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado<sup>1</sup>, Wagner Cotroni Valenti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista/CAUNESP – Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil.

### ABSTRACT

The formulation of a balanced diet, which provides the requirements of lipids in *Macrobrachium rosenbergii* larvae is important to guarantee good productivity of post-larvae. Hence, the effect of different levels of lipids in the inert diet on the principal production variables was evaluated during the hatchery of the *Macrobrachium rosenbergii*. It was used a randomized block experimental design with four treatments and four replicates. Two days after hatching, the larvae were feeding by increasing quantities of *Artemia* nauplii. From the 11<sup>th</sup> day on (zoea VII), co-feeding started, when diet-tests plus *Artemia* nauplii were offered until the end of the rearing cycle. In the 26<sup>th</sup> day, when approximately 90% of the larvae turned into post larvae (PL), harvest was done. It was calculated the survival rate, percentage of larvae, productivity (PL L<sup>-1</sup>) and final biomass of PL in all treatments by means of individual count. The major final biomass of PL was found in the levels of 16 and 20 % of lipid, being statistically different in the levels of 12 and 24 %. The level of 16% of lipid in the inert diet determined increase in the percentage of PL at the end of the culture (P <0.05) when it was compared with the level of 12 %. Of the same form, the productivity (PL L<sup>-1</sup>) was significantly major with 16 % of lipid in the diet, when compared with other levels. It seems that 16 % of dietary lipid in the inert diet plus *Artemia* nauplii during hatchery is a suitable level to increase productivity. However, lower levels may be used if the fat acids profile was optimized.

**Keywords:** Giant River Prawn, Larviculture, Dietary Lipid

## NIVELES DIETÉTICOS DE LÍPIDOS PARA LA LARVICULTURA DE *Macrobrachium rosenbergii*

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado<sup>1</sup>, Wagner Cotroni Valenti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista/CAUNESP – Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

### RESUMEN

La formulación de una dieta balanceada que atienda las exigencias de lípidos en las larvas de *Macrobrachium rosenbergii*, es importante para garantizar mejor productividad al final de la larvicultura. Se evaluó el efecto de diferentes niveles de lípidos en la dieta sobre las principales variables de producción durante la larvicultura de *Macrobrachium rosenbergii*. Además, se determinó el perfil de ácidos grasos en el cuerpo de las postlarvas, náuplios de *Artemia* y en las diferentes dietas. El diseño experimental fue en bloques al azar, con cuatro tratamientos, correspondientes a cuatro niveles de lípidos (12, 16, 20 y 24%) y cuatro repeticiones. Dos días después de la eclosión las larvas pasaron a ser alimentadas con cantidades crecientes de náuplios de *Artemia*. A partir del 11º día (zoea VII), se inició la alimentación conjunta, ofreciendo las dietas-teste acompañadas por los náuplios de *Artemia* hasta el final del ciclo de larvicultura. El 26º día de cultivo, cuando aproximadamente el 90% de las larvas se metamorfosearon en postlarvas (PL), se realizó la cosecha. Fue calculada la tasa de sobrevivencia, la biomasa final de PL, el porcentaje de larvas y la productividad (PL L<sup>-1</sup>) en cada tratamiento. Se observó que las larvas de *M. rosenbergii* alimentadas con dieta inerte conteniendo 16% de lípido mejoraron significativamente el número de post-larvas producidas al final de la larvicultura. Se puede concluir que 16% de lípido en la dieta durante la larvicultura es el nivel más adecuado para aumentar a productividad de esta especie. Sin embargo, niveles menores podrían ser usados si el perfil de ácidos grasos fuese optimizado.

**Palabras clave:** Camarón Gigante de Malasia, larvicultura, lípido dietético

## DES NIVEAUX DIÉTÉTIQUES DE LIPIDES POUR LA LARVECULTURE DE *Macrobrachium rosenbergii*.

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado<sup>1</sup>, Wagner Cotroni Valenti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista/CAUNESP – Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

### RÉSUMÉ

La formulation d'un régime alimentaire équilibré que puisse répondre aux besoins de lipides des larves de *Macrobrachium rosenbergii* est très important pour assurer des meilleures productivités à la fin de la larveculture. L'effet de différents niveaux de lipides sur la diète inerte a été évalué sur les principaux variables de production tout au long de la larveculture de *Macrobrachium rosenbergii*. Des blocs aléatoires ont été choisis pour l'experimentation, avec quatre traitements qui correspondent à quatre niveaux de lipide (12, 16, 20 et 24%) et quatre répétitions. Deux jours après l'éclosion les larves ont été nourries avec des quantités croissantes de nauplii d'*Artemia*. A partir du onzième jour (zoea VII), la coalimentation a été introduite en fournissant les diètes-teste en plus des nauplii d'*Artemia* jusqu'à la fin du cycle de larveculture. Au 26ème jour du cycle où 90% des larves, à peu près, se sont déjà méthamorphosées en pos-larves (PL), la récolte de fin d'élevage a été faite. Le taux de survie, la biomasse finale de PL, la pourcentage de larves et la productivité (PL L<sup>-1</sup>) ont été calculés pour chaque traitement. On a pu observer que les larves de *M. rosenbergii* qu'ont été nourries par une diète inerte de 16% de lipide ont beaucoup amélioré le numero de pos-larves qu'ont été produites par litre à la fin de l'larveculture. On a pu conclure que 16% de lipide dans la diète au long de la larveculture comercial est le niveau le meilleur pour augmenter la production de l'espèce.

**Mots clés:** Crevette géant d'eau douce, larveculture, lipide diététique.

## 1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de larvicultura do camarão-da-malásia *Macrobrachium rosenbergii* têm-se tornado mais eficientes nas últimas décadas. No entanto, pesquisas sobre exigências nutricionais das larvas desta espécie ainda são insuficientes. A larvicultura comercial depende do uso de alimento vivo, basicamente de náuplios de *Artemia*. Não obstante, a produção e uso desses náuplios é muito cara (Cahu e Zambonino-Infante, 2001; Hung et al., 2002) e nutricionalmente incompleta (Sorgeloss e Leger, 1992) fazendo-se necessária a alimentação conjunta com dieta inerte durante o processo de larvicultura. Daniels et al. (1992), Valenti et al. (1998) e Pitipornchai (1998) afirmaram que os náuplios de *Artemia* não atendem as exigências nutricionais de *M. rosenbergii* nos últimos estágios larvais. Portanto, a disponibilidade de uma dieta inerte balanceada seria desejável para melhorar o desempenho produtivo e reduzir os custos operacionais da larvicultura (Kamarudin e Roustaian, 2002). Até o estágio VI, a principal fonte de nutrientes para as larvas de *M. rosenbergii* é o alimento vivo, mas a partir do estágio seguinte as larvas ingerem indistintamente náuplios de *Artemia* ou ração inerte (Barros e Valenti, 2003). Portanto, o conhecimento das exigências lipídicas nas larvas desta espécie durante a fase de zoea VII até a metamorfose em pós-larva (PL) torna-se muito importante para formular uma dieta balanceada.

A dieta inerte atualmente utilizada durante a larvicultura desta espécie é um creme de ovo ou pudim, composto por uma mistura de ingredientes (ovo, lula, filé de peixe, leite em pó, farinha de trigo, óleo de bacalhau e um suplemento vitamínico-mineral). Esta dieta contém aproximadamente 23% de lipídeo, mas essa porcentagem pode variar de acordo com os ingredientes usados. Por exemplo, na Indonésia e Tailândia a porcentagem de lipídeo utilizado no preparo do pudim varia entre 4,5% e 39,4% (Lavens et al., 2000), dependendo dos ingredientes e das proporções utilizadas na sua elaboração. Kamarudin e Roustaian (2002) testaram duas fontes lipídicas, uma de origem animal (óleo de fígado - OF) e outra de origem vegetal (óleo de milho - OM) usando diferentes proporções (OF: OM) 1:0; 2:1; 1:1; 1:2 e 0:1, fixando o nível de lipídeo na dieta em ~ 12,0%, obtendo bons resultados quando no mínimo fosse usada uma proporção de OF:OM de 1:2. Estes autores determinaram que a composição em ácidos graxos das dietas variou em função da proporção das fontes lipídicas e não no nível de lipídeo. Contudo, o presente estudo pretendeu, ao contrário do realizado por Kamarudin e Roustaian (2002), fixar as proporções das fontes lipídicas e variar somente

os níveis de lipídeos. Não existem relatos na literatura científica dos efeitos de diferentes níveis de lipídeos na dieta sobre o desempenho produtivo desta espécie durante a fase larval. Portanto, o objetivo da presente pesquisa foi determinar o nível mais adequado de suplementação de lipídeos na dieta inerte que garanta máxima sobrevivência e produtividade (PL L<sup>-1</sup>) durante a larvicultura de *M. rosenbergii*, bem como a composição principal de ácidos graxos essenciais no corpo das pós-larvas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Origem dos animais e condições experimentais

As larvas de *Macrobrachium rosenbergii* foram obtidas de fêmeas ovígeras capturadas nos viveiros do Setor de Carcinicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP (Jaboticabal, SP, Brasil). As fêmeas, com peso médio de  $53,8 \pm 8,7$  g, foram desinfetadas em solução de formaldeído 25 ppm por vinte minutos e, em seguida, transferidas para um tanque de eclosão com temperatura e salinidade da água variando de 29,4 a 30,9°C e 5,8 a 6,0‰, respectivamente. Larvas recém eclodidas (peso inicial ~ 28,3 µg) foram coletadas, contadas e aclimatadas nos tanques de larvicultura em uma densidade de 80 larvas/L. Os oito tanques utilizados eram de cor preta, cilíndricos e de fundo cônico, com volume útil de 120 L, acoplados a biofiltros e operados em sistema fechado dinâmico (Valenti e Daniels, 2000). O volume do biofiltro correspondia a 25% do volume total do tanque de larvicultura. Utilizou-se cascalho de conchas de moluscos como substrato para bactérias nos biofiltros. O fotoperíodo utilizado foi 13/11 (claro/escuro). As seguintes variáveis da água foram monitoradas diariamente: temperatura (°C), pH, salinidade (‰) e condutividade (µS/cm). Para a medição destas variáveis foi usado a sonda multiparâmetro (YSI – Modelo 63). A taxa de recirculação da água do tanque de larvicultura pelo biofiltro (%/dia), também foi monitorada diariamente. A alcalinidade (mg/L) foi medida uma vez por semana, segundo a metodologia da APHA (2005). A amônia (NH<sub>3</sub>-N) e o nitrito (NO<sub>2</sub>-N) foram monitorados quatro vezes por semana, usando testes colorimétricos da MERCK®. Os valores médios em todos os tratamentos foram: temperatura  $30,3 \pm 0,4$ °C, pH  $7,85 \pm 0,15$ , salinidade  $12,07 \pm 0,10$  ‰, condutividade  $20,35 \pm 0,16$  µS/cm, alcalinidade  $87,9 \pm 12,8$  mg/L, amônia  $11,2 \pm 3,2$  µg/L, nitrito  $41,0 \pm 12,8$  µg/L e taxa de recirculação da

água de  $18,8 \pm 3,4$  %/dia. Estes valores foram mantidos dentro das faixas recomendadas por Valenti e Daniels (2000) para *M. rosenbergii*.

## 2.2. Alimentação das larvas e dietas experimentais

A partir das 48 horas após a eclosão e até o final do ciclo de larvicultura (26° dia), as larvas de dos diferentes tratamentos foram alimentadas diariamente ao entardecer (18:30h), com quantidades crescentes de náuplios de *Artemia* recém eclodidos (Tabela 1). Do 11° dia (Zoea VII) ao 25° dia foi feita a co-alimentação com dieta inerte. Foram utilizadas quatro dietas inertes com ~ 64% de umidade, contendo quatro níveis de lipídeos (12, 16, 20 e 24%). Todas as dietas formuladas foram: isoprotéicas ( $44,5 \pm 0,6$  % de proteína bruta) e isocalóricas ( $5.111 \pm 108$  kcal/kg de Energia Bruta). Para manter todas as dietas isocalóricas foi utilizado como fonte de energia o amido de milho, em proporções decrescentes na medida em que aumentavam os níveis de lipídeo. Para variar as porcentagens de lipídeo nas dietas foram utilizadas duas fontes: o óleo de peixe (OP) e o óleo de milho (OM), que mantiveram uma relação OP:OM de 0,5:1. A somatória destas fontes variou na porcentagem de inclusão das dietas inertes assim: 2,5%, 3,7%, 4,9% e 6%, para os níveis de 12, 16, 20 e 24% de lipídeo, respectivamente.

Tabela 1. Tabela de alimentação usada durante a larvicultura de *M. rosenbergii*. Quantidades médias de cistos de *Artemia* utilizados para cada uma das quatro dietas experimentais.

Dias de cultivo	Estágios dominantes	Náuplios de <i>Artemia</i> /mL	Cistos de <i>Artemia</i> (g/día)
Povoamento	I	0,0	0
2	I-II	4,5	3,03
3	II-III	5,0	3,37
4	III	5,5	3,70
5	III-IV	5,5	3,70
6-7	IV-V	6,0	4,04
8	V	6,0	4,04
9-10	V-VI	6,0	4,04
11-12	VI-VII	7,0	4,71
13-14	VI-VII-VIII	8,0	5,38
15-18	VII-VIII-IX	9,0	6,06
19-21	VIII-IX	10,0	6,73
22-24	IX-X-XI	11,0	7,40
25-28	XI-PL	12,0	8,08

A taxa de eclosão média foi de 178.300 náuplios de *Artemia*/g de cistos

As dietas foram suplementadas com 1% de fósforo na forma de Fosfato de Sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), seguindo a recomendação de Guerrero-Alvarado e Valenti (2009, dados não publicados). Também foram suplementadas fontes de potássio (KCl) e de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), em porcentagem fixa de 1,10 e 0,18%, respectivamente, em cada um dos tratamentos. A formulação e composição proximal das dietas experimentais e dos náuplios de *Artemia* são apresentados na Tabela 2.

Os ingredientes das dietas foram pesados individualmente e moídos em micro-moinho (IKA modelo A11 Basic) e posteriormente combinados com os ingredientes úmidos em um liquidificador. A pasta homogênea resultante foi transferida para uma forma de alumínio e cozida em banho-maria por aproximadamente 30 minutos a uma temperatura máxima de 55°C. Após resfriamento, as dietas foram divididas em porções suficientes para um dia de alimentação. Essas porções foram armazenadas em sacos plásticos a - 20°C (Valenti et al., 1998). A quantidade diária fornecida ao longo da larvicultura variou da seguinte forma: do 11° ao 12° dia (41,75 mg/L), do 13° ao 18° dia (50,0 mg/L), do 19° ao 21° dia (60 mg/L) e do 22° ao 25° dia (70 mg/L). Estas quantidades foram divididas em três refeições ao longo do dia e ofertadas às 8h, 13h e 18h. Antes do fornecimento, as dietas passavam por peneiras de malha de 250  $\mu\text{m}$  (11° e 12° dias), 425  $\mu\text{m}$  (13° ao 21° dia) e 710  $\mu\text{m}$  (22° ao 25° dia). Posteriormente, eram distribuídas manualmente nos tanques correspondentes aos respectivos tratamentos. A cada dois dias era realizada a sifonagem dos tanques para retirada de resíduos de alimento, fezes e larvas mortas.

### 2.3. Composição química

A composição química centesimal das dietas experimentais e dos náuplios de *Artemia* foi determinada conforme a metodologia descrita pela AOAC (1998). O teor de matéria seca (MS) foi determinado, submetendo-se as amostras à secagem em estufa a 105°C por 16 horas. O teor de proteína bruta (PB) foi calculado pelo conteúdo de nitrogênio total, determinado pelo método de Kjeldahl e multiplicado pelo fator 6,25. O extrato etéreo (EE) foi analisado após extração em Soxhlet, tendo como solvente o éter de petróleo (ponto de ebulição 30 – 60°C), com refluxo contínuo através da amostra, durante 5 horas.

Tabela 2. Formulação e composição proximal das dietas experimentais e dos náuplios de *Artemia* utilizados na larvicultura de *M. rosenbergii*.

<i>Ingredientes (% base úmida)</i>	<i>Níveis de lipídeo (%)</i>				<i>Náuplios Artemia</i>
	<b>12</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	
Clara de ovo de galinha	45,29	45,29	45,29	45,29	
Lula	23,39	23,39	23,39	23,39	
Filé de tilápia	17,42	17,42	17,42	17,42	
<b>Amido de milho<sup>a</sup></b>	<b>4,98</b>	<b>3,43</b>	<b>2,03</b>	<b>1,34</b>	
<b>Óleo de milho<sup>b</sup></b>	<b>1,64</b>	<b>2,48</b>	<b>3,24</b>	<b>3,98</b>	
<b>Óleo de peixe<sup>c</sup></b>	<b>0,82</b>	<b>1,24</b>	<b>1,62</b>	<b>1,99</b>	
Leite em pó <sup>d</sup>	1,29	1,29	1,29	1,29	
Gema de ovo de galinha	1,19	1,19	1,19	1,19	
Farinha de trigo <sup>e</sup>	0,55	0,55	0,55	0,55	
Suplemento vitamínico-mineral <sup>f</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	
Vitamina C <sup>g</sup>	0,15	0,15	0,15	0,15	
Fósforo (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sup>h</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	
KCl <sup>i</sup>	1,10	1,10	1,10	1,10	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O <sup>j</sup>	0,18	0,18	0,18	0,18	
SiO <sub>2</sub> <sup>k</sup>	0,00	0,28	0,56	0,13	
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	
(%) de umidade	61,37	64,22	65,00	66,81	90,33

*Composição analisada (100% MS)*

Proteína bruta (PB)	43,5 ± 0,1	44,6 ± 0,1	44,9 ± 0,1	44,8 ± 0,1	57,3 ± 0,3
<b>Extrato etéreo (EE)</b>	<b>11,8 ± 0,1</b>	<b>16,2 ± 0,1</b>	<b>20,3 ± 0,1</b>	<b>23,8 ± 0,1</b>	16,1 ± 0,1
Fibra bruta (FB)	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	2,7 ± 0,2
Matéria mineral (MM)	12,5 ± 0,2	13,4 ± 0,2	14,3 ± 0,2	12,9 ± 0,2	10,4 ± 0,3
Extrato não nitrogenado (ENN)	31,7 ± 0,5	25,3 ± 0,5	20,0 ± 0,5	18,0 ± 0,5	13,5 ± 0,9
Energia bruta (EB) (kcal/kg)	4.962,3	5.098,8	5.184,8	5.197,1	4.805,5
Relação energia:proteína (kg/g)	11,4:1,0	11,4:1,0	11,5:1,0	11,6:1,0	8,4:1,0

Maizena<sup>®</sup> composição em (100 g): carboidratos 85 g. <sup>b</sup>Liza<sup>®</sup> composição em (100 g): ácido linoléico 47,50 g, ácido oléico 35,37 g, ácido palmítico 12,42 g, ácido esteárico 1,92 g, ácido linolênico 1,66, outros 1,11 g; Vitamina E 16,6 mg; <sup>c</sup>Magrylife<sup>®</sup> composição em (100 g): EPA 55 g, DHA 36,4 g, colesterol 0,6 g, outros 8 g; <sup>d</sup>Nestle<sup>®</sup>: composição em (100g): K 1,26g; Ca 0,97g; P 0,72g; Na 0,33g; Mg 0,08g; ácido pantotênico 2,77mg; riboflavina 1,38 mg; cobalamina 2,62µg. <sup>e</sup>Nita<sup>®</sup>: composição em (100g): Ca 18mg; Ferro 1,2 mg. <sup>f</sup>Premix vitamínico-mineral Fri-Ribe (mg/100 g): vitamina B<sub>1</sub> 3,0; vitamina B<sub>2</sub> 2,5; vitamina B<sub>6</sub> 3,5; vitamina B<sub>12</sub> 4,0; vitamina C 15,0; vitamina E 15,0; vitamina K 0,3; vitamina A 1000,0 IU, vitamina D 300,0 UI; ácido fólico 0,4; ácido pantotênico 5,0; Colina 40,0; Biotina 0,1; Niacina 10,0; Zn 15,0; Cu 5,0; Mn 4,0; Fe 2,0; I 0,15; Cr 0,06; Co 0,03; Se 0,03; antioxidante 10,0. <sup>g</sup>Vit. C (ácido L-ascórbico-2-polifostato). <sup>h</sup>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth). <sup>i</sup>KCl (JT Baker). <sup>j</sup>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Mallinckrodt, Chemicals). <sup>k</sup>Celite<sup>®</sup>.

O conteúdo de fibra bruta (FB) foi obtido a partir das amostras secas e desengorduradas, submetidas à digestão ácida ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  – 1,25%) e básica (NaOH – 1,25%) durante 30 minutos por digestão, e posterior queima do resíduo em mufla, a 500 °C. A concentração de matéria mineral (MM) foi determinada carbonizando-se as amostras em mufla a 600°C por 3 horas. O teor de extrativo não nitrogenado (ENN) foi obtido subtraindo de cem por cento da matéria seca o total de nutrientes analisados. A determinação da energia bruta (EB) foi realizada em bomba calorimétrica de Parr (modelo 1281). Todas as análises foram realizadas em triplicata, com exceção da energia bruta (EB), a qual foi determinada em uma única análise.

### 2.3.1 Análises de lipídeo total e de ácidos graxos

A quantificação dos lipídeos totais (LT) foi realizada seguindo a metodologia de extração de Bligh e Dyer (1959). Os ácidos graxos foram determinados por meio de cromatográfico a gás (CG-14B Shimadzu), equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m, 0,25 mm e 0,25  $\mu\text{m}$ ) (nº. cat. 24136-Supelco) e detector de ionização em chama. A razão de divisão (split) da amostra foi de 1/100. A coluna operou sob as seguintes condições: injetor e detector, respectivamente, a 250 e 280°C e programa de temperatura de 50°C por 2 minutos, elevando-se a temperatura para 220°C a uma taxa de 4°C  $\text{min}^{-1}$ . O volume injetado foi de 1 $\mu\text{L}$  para cada mostra com duas repetições. A identificação foi realizada mediante comparação dos tempos de retenção de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma no. cat. 189-19). A identificação dos ácidos graxos foi realizada pela comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras com o de padrões conhecidos. O teor de cada ácido graxo nas amostras foi calculado como segue:

$\text{AG}_i = (A \times L \times F)/100$  em que:

$\text{AG}_i$  = teor do ácido graxo na amostra ( $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ );

A = porcentagem de área de cada um dos picos obtidos nos cromatogramas;

L = teor de gordura da amostra ( $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ );

F = 0,910, fator que corrige o teor de gordura para componentes lipídicos que não são ácidos graxos (Holland et al., 1994).

Os perfis de ácidos graxos das dietas experimentais e dos náuplios de *Artemia* utilizados na alimentação das larvas são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição de ácidos graxos (g/100 g) das dietas experimentais e dos náuplios de *Artemia*.

Ácido graxo (AG)	Nível de lipídeo (%)				<sup>a</sup> Náuplios de <i>Artemia</i>
	12	16	20	24	
8:0 (Caprilico)	0,01	0,01	0,01	0,01	nd
10:0 (Caprico)	0,02	0,02	0,02	0,02	nd
12:0 (Láurico)	0,03	0,03	0,03	0,03	nd
14:0 (Mirístico)	0,19	0,18	0,18	0,17	0,09
14:1 (Miristoleico)	0,01	0,01	0,01	0,01	nd
15:0 (Pentadecanoico)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>16:0 (Palmítico)</b>	<b>2,10</b>	<b>2,39</b>	<b>2,89</b>	<b>3,38</b>	1,83
16:1 <i>n</i> -7 (Palmitoléico)	0,12	0,11	0,11	0,11	0,26
17:0 (Heptadecanoico)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,07
<b>18:0 (Esteárico)</b>	<b>0,55</b>	<b>0,57</b>	<b>0,62</b>	<b>0,69</b>	0,78
<b>18:1 <i>n</i>-9 (Oléico)</b>	<b>3,72</b>	<b>4,80</b>	<b>6,08</b>	<b>7,34</b>	3,98
<b>18:2 <i>n</i>-6 (Linoléico)</b>	<b>3,90</b>	<b>5,56</b>	<b>7,35</b>	<b>9,01</b>	1,10
18:3 <i>n</i> -6 ( $\gamma$ -Linolênico)	nd	nd	nd	nd	0,13
<b>18:3 <i>n</i>-3 (<math>\alpha</math>-Linolênico)</b>	<b>0,16</b>	<b>0,18</b>	<b>0,21</b>	<b>0,24</b>	5,78
20:1 <i>n</i> -9 (Eicosenoico)	0,06	0,06	0,09	0,10	0,11
20:2 (Eicosadienoico)	nd	nd	nd	nd	0,04
20:3 <i>n</i> -3 (Eicosatrienoico)	nd	nd	nd	nd	0,04
20:4 <i>n</i> -6 (Araquidônico)	nd	nd	nd	nd	0,21
20:5 <i>n</i> -3 ( <sup>b</sup> EPA)	0,15	0,13	0,13	0,14	0,25
22:6 <i>n</i> -3 ( <sup>c</sup> DHA)	0,35	0,31	0,30	0,32	nd
Não identificado	nd	nd	nd	nd	0,75
<b><math>\Sigma</math> Ácidos graxos - AG (%)</b>	<b>11,42</b>	<b>14,40</b>	<b>18,10</b>	<b>21,61</b>	15,41
Lipídeos que não são AG (%)	1,13	1,43	1,79	2,14	1,53
<b><sup>d</sup>Lipídeo total (%)</b>	<b>12,55</b>	<b>15,83</b>	<b>19,89</b>	<b>23,75</b>	16,94
$\Sigma$ Saturados	2,94	3,24	3,80	4,35	2,78
$\Sigma$ Insaturados	8,48	11,16	14,30	17,26	12,63
Insaturados/saturados	2,88	3,45	3,76	3,97	4,54
$\Sigma$ monoinsaturados	3,91	4,98	6,29	7,55	5,09
$\Sigma$ Saturados e monoinsaturados	6,85	8,22	10,10	11,90	7,88
$\Sigma$ Poliinsaturados	4,57	6,18	8,00	9,71	7,53
$\Sigma$ <i>n</i> -6 <sup>e</sup> PUFA	3,90	5,56	7,35	9,01	1,43
$\Sigma$ <i>n</i> -3 <sup>f</sup> HUFA	0,22	0,23	0,25	0,28	5,81
DHA/EPA	2,30	2,32	2,26	2,31	-
HUFA/PUFA	0,06	0,04	0,03	0,03	4,06

<sup>a</sup>Grupo INVE, Bélgica. <sup>b</sup>Ácido eicosapentaenóico. <sup>c</sup>Ácido docosahexaenóico. <sup>d</sup>Metodologia de extração de Bligh e Dyer (1959). <sup>e</sup>Ácido graxo poliinsaturado. <sup>f</sup>Ácido graxo altamente poliinsaturado. nd: não detectado. Os ácidos graxos que aumentaram com o acréscimo no nível de lipídeo das dietas estão indicados em negrito.

## 2.4. Variáveis de produção na larvicultura

O final da larvicultura ocorreu no 26º dia, quando aproximadamente 90% das larvas dos melhores tratamentos metamorfosearam-se em pós-larvas (PL). Os tanques de larvicultura foram esvaziados e as larvas e pós-larvas (PL) coletadas e contadas individualmente. Foram determinadas as seguintes variáveis de produção: porcentagem de sobrevivência total, porcentagem de larvas e pós-larvas (PL), peso seco final, biomassa de PL e produtividade (PL L<sup>-1</sup>). Para determinar o peso seco final, 50 PL de cada tanque de larvicultura foram lavadas em água destilada, secas em papel de filtro e transferidas para cartuchos de papel alumínio pré-pesados (5 PL/cartucho). Os cartuchos foram levados à estufa com sistema de circulação (Nova Ética) mantendo a temperatura em 55°C, por 48 h. Logo após, os cartuchos foram transferidos para um dessecador e, depois de duas horas, foram pesados em balança analítica (Mettler Toledo AT21, precisão de 1 µg). A biomassa em PL foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Biomassa em PL (g)} = (\text{n}^\circ \text{ de PL final} \times \text{peso seco final médio (mg)}) / 100$$

### 2.4.1. Índice de estágio larval (IEL)

Para a avaliação do efeito dos níveis de lipídeo no desenvolvimento larval, amostras de 10 larvas de cada tanque de cultivo foram examinadas a cada três dias sob microscópio invertido (Olympus CKX41) para observação do estágio larval. O índice de estágio larval (IEL) foi determinado de acordo com o método da média ponderada de Manzi et al. (1977), indicado pela fórmula:

$$\text{IEL} = \frac{\sum ni.E}{n}$$

Sendo:

ni = nº de larvas no estágio E;

E = estágio de desenvolvimento, variando de I a XII;

n = nº de unidades da amostra.

Os XII estágios larvais foram identificados segundo as descrições de Uno e Kwon (1969). As pós-larvas recém metamorfoseadas (estágio XII), não foram consideradas para os cálculos do índice de estágio larval.

#### 2.4.2. Índice de condição larval (ICL)

O índice de condição larval foi verificado seguindo a planilha desenvolvida por Tayamen e Brown (1998) para *M. rosenbergii*. Os itens analisados foram: condições do intestino, condições do hepatopâncreas, estado dos cromatóforos, coloração do corpo, estado do rostro e cerdas, proporção da musculatura em relação ao intestino, aparência do músculo do abdome, melanização e presença de organismos infestantes. O índice de condição larval (ICL) foi determinado de acordo com a fórmula:

$$IC = \frac{\sum P}{10n}$$

Sendo P = total de pontos; n = n° da amostra.

#### 2.5. Delineamento experimental e análise dos dados

Utilizou-se um delineamento experimental em blocos casualizados temporais, com quatro tratamentos (12, 16 20 e 24% de lipídeo na dieta) e quatro repetições. Os valores expressos em porcentagens foram previamente transformados em arco seno  $\sqrt{x/100}$ . As seguintes variáveis de produção foram submetidas à Análise de Variância: % de sobrevivência total, % de larvas, % de pós-larvas, peso seco final (mg), biomassa em pós-larvas (g), produtividade (PL L<sup>-1</sup>) e os índices de estágio larval e condição larval que foram avaliados no dia anterior a despesca.

Os dados foram submetidos à análise da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e de homocedasticidade pelo teste Brown-Forsythe. Quando encontradas diferenças significativas nas variáveis de produção (P<0,05), as médias dos tratamentos foram comparadas com o teste de Tukey ou de Duncan, tendo-se em conta o coeficiente de variação encontrado. Consideraram-se médias diferentes quando P<0,05. As análises estatísticas foram realizadas no “*Statistical Analysis System*” (SAS Institute Inc., version 9.0).

### 3. RESULTADOS

As respostas no crescimento das larvas de *M. rosenbergii* alimentadas por 15 dias com dieta inerte contendo diferentes níveis de lipídeo são apresentadas na Tabela 4. No parâmetro sobrevivência não foi observada diferença significativas entre os tratamentos ( $P>0,05$ ). As larvas alimentadas com 16% de lipídeo na dieta tiveram porcentagens de larvas significativamente menores quando comparadas com o tratamento de 12% de lipídeo. No entanto, larvas alimentadas com nível de 16% de lipídeo tiveram porcentagens de pós-larvas estatisticamente maiores ( $P<0,05$ ) quando comparadas com o nível de 12%. Níveis de 16% de lipídeo na dieta aumentaram significativamente a produtividade ( $PL L^{-1}$ ) (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito de diferentes níveis de lipídeo sobre a sobrevivência, a porcentagem de larvas e pós-larvas (PL), a produtividade, o peso seco, a biomassa de PL, o índice de estágio larval (IEL) e a porcentagem de lipídeo na carcaça das pós-larvas de *M. rosenbergii*.

Parâmetro de crescimento	Nível de lipídeo (%)			
	12	16	20	24
Sobrevivência (%)	62,00 ± 6,26 <sup>a</sup>	70,10 ± 4,58 <sup>a</sup>	67,36 ± 6,42 <sup>a</sup>	62,41 ± 6,65 <sup>a</sup>
Larvas (%)	16,65 ± 6,14 <sup>a</sup>	2,55 ± 2,40 <sup>b</sup>	9,09 ± 5,73 <sup>ab</sup>	7,79 ± 3,61 <sup>ab</sup>
PL (%)	45,35 ± 10,19 <sup>b</sup>	67,55 ± 4,71 <sup>a</sup>	58,27 ± 6,06 <sup>ab</sup>	54,62 ± 9,62 <sup>ab</sup>
Produtividade ( $PL L^{-1}$ )	36,28 ± 8,15 <sup>c</sup>	54,04 ± 3,77 <sup>a</sup>	46,62 ± 4,85 <sup>b</sup>	43,69 ± 7,69 <sup>b</sup>
Peso seco (mg)	1,35 ± 0,24 <sup>c</sup>	1,35 ± 0,22 <sup>bc</sup>	1,51 ± 0,34 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,26 <sup>ab</sup>
Biomassa PL (g)	5,74 ± 1,08 <sup>c</sup>	8,72 ± 1,10 <sup>a</sup>	8,48 ± 2,22 <sup>a</sup>	7,55 ± 1,36 <sup>b</sup>
IEL	9,4 ± 0,4 <sup>c</sup>	11,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	10,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	11,1 ± 0,2 <sup>b</sup>
ICL	1,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,8 ± 0,1 <sup>b</sup>
Lipídeo carcaça (%)	6,52 ± 0,03 <sup>c</sup>	7,28 ± 0,01 <sup>b</sup>	7,38 ± 0,03 <sup>b</sup>	7,59 ± 0,03 <sup>a</sup>

Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) para quatro determinações. Médias seguidas na mesma linha por letras distintas são estatisticamente diferentes ( $P<0,05$ ).

Larvas alimentadas com níveis de lipídeo de 12 e 16% apresentaram valores de peso seco estadisticamente menores quando comparadas com as pós-larvas alimentadas com 20% de lipídeo ( $P<0,05$ ). As maiores biomassas de pós-larvas foram encontradas

nos tratamentos com 16 e 20% de lipídeo, diferindo estatisticamente ( $P < 0,05$ ) dos demais.

O maior índice de estágio larval foi encontrado no tratamento com nível de inclusão de 16% de lipídeo, diferindo estatisticamente ( $P < 0,05$ ) dos demais. O índice de condição larval foi significativamente menor nos tratamentos com níveis de 12 e 24% de lipídeo. De um modo geral, ocorreu aumento na deposição de lipídeos na carcaça (exoesqueleto) das pós-larvas com aumento do teor de lipídeos na dieta. No entanto, não foram observadas diferenças significativas para a deposição de lipídeo na carcaça das pós-larvas entre os tratamentos com 16 e 20% de lipídeo, contudo estes diferiram significativamente dos tratamentos com 12 e 24%, como se observa na Tabela 4.

Os ácidos graxos mais abundantes na carcaça das pós-larvas foram o oléico, o palmítico e o esteárico. No tratamento com 24% de lipídeo foram encontradas as maiores quantidades do ácido oléico e palmítico, quando comparado com os outros tratamentos (Tabela 5). A composição em ácido esteárico e EPA não variaram estatisticamente entre os tratamentos. Por outro lado, houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na composição de DHA no tratamento com 16% de lipídeo, que apresentou o valor mais elevado, quando comparado com os demais tratamentos. A relação DHA/EPA não apresentou diferença entre tratamentos.

Na carcaça das PLs de *M. rosenbergii* os ácidos graxos que aumentaram proporcionalmente ao incremento do nível de lipídeos na dieta foram: ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1 n-9) e ácido linoléico (18:2 n-6). O ácido mirístico (14:0), o ácido pentadecanoico (15:0), o ácido palmitoléico (16:1 n-7), o ácido heptadecanoico (17:0), o ácido araquidônico (20:4 n-6) e o ácido eicosapentaenóico - EPA (20:5 n-3), não apresentaram aumentos percentuais na carcaça das PLs em nenhuma das dietas testadas.

Tabela 5. Composição de ácidos graxos (mg/100 mg) na carcaça de pós-larvas de *M. rosenbergii* alimentadas com diferentes níveis de lipídeo.

Ácidos graxos (AG)	Nível de lipídeo (%)			
	12	16	20	24
8:0 (Caprilico)	nd	nd	nd	nd
10:0 (Caprico)	nd	nd	nd	nd
12:0 (Láurico)	nd	nd	nd	nd
14:0 (Mirístico)	0,10 ± 0,00a	0,10 ± 0,00a	0,09 ± 0,00a	0,10 ± 0,00a
14:1 (Miristoleico)	nd	nd	nd	nd
15:0 (Pentadecanoico)	0,02 ± 0,00a	0,02 ± 0,00a	0,02 ± 0,00a	0,02 ± 0,00a
<b>16:0 (Palmítico)</b>	<b>1,39 ± 0,03c</b>	<b>1,57 ± 0,05b</b>	<b>1,58 ± 0,04b</b>	<b>1,67 ± 0,04a</b>
16:1 <i>n</i> -7 (Palmitoléico)	0,04 ± 0,00a	0,04 ± 0,00a	0,04 ± 0,00a	0,04 ± 0,00a
17:0 (Heptadecanoico)	0,07 ± 0,00a	0,07 ± 0,00a	0,07 ± 0,00a	0,06 ± 0,00a
<b>18:0 (Estearico)</b>	<b>0,80 ± 0,03a</b>	<b>0,80 ± 0,03a</b>	<b>0,86 ± 0,03a</b>	<b>0,83 ± 0,02a</b>
<b>18:1 <i>n</i>-9 (Oléico)</b>	<b>1,46 ± 0,04d</b>	<b>1,73 ± 0,05b</b>	<b>1,67 ± 0,05c</b>	<b>1,77 ± 0,05a</b>
18:2 <i>n</i> -6 (Linoléico)	0,52 ± 0,03c	0,62 ± 0,02bc	0,71 ± 0,02ab	0,80 ± 0,03a
18:3 <i>n</i> -6 (γ-Linolênico)	nd	nd	nd	nd
18:3 <i>n</i> -3 (α-Linolênico)	0,59 ± 0,02b	0,62 ± 0,02ab	0,70 ± 0,02a	0,61 ± 0,01b
20:1 <i>n</i> -9 (Eicosenoico)	0,02 ± 0,00a	nd	0,02 ± 0,00a	nd
20:2 (Eicosadienoico)	0,03 ± 0,00ab	0,03 ± 0,00b	0,04 ± 0,00a	0,03 ± 0,00ab
20:3 <i>n</i> -3 (Eicosatrienoico)	0,08 ± 0,01c	0,11 ± 0,00b	0,10 ± 0,00bc	0,14 ± 0,00a
20:4 <i>n</i> -6 (Araquidônico)	0,07 ± 0,01a	0,07 ± 0,00a	0,07 ± 0,00a	0,06 ± 0,00a
20:5 <i>n</i> -3 ( <sup>a</sup> EPA)	0,51 ± 0,03a	0,61 ± 0,03a	0,55 ± 0,03a	0,57 ± 0,03a
22:6 <i>n</i> -3 ( <sup>b</sup> DHA)	0,22 ± 0,01b	0,23 ± 0,01a	0,20 ± 0,01d	0,21 ± 0,01c
Σ Ácidos graxos - AG (%)	5,93c	6,62b	6,72b	6,91a
Lipídeos que não são AG (%)	0,59	0,66	0,66	0,68
<sup>c</sup> Lipídeo total (%)	6,52c	7,28b	7,38b	7,59a
Σ Saturados	2,37 ± 0,06c	2,55 ± 0,08b	2,63 ± 0,03ab	2,68 ± 0,06a
Σ Insaturados	3,56 ± 0,06c	4,07 ± 0,08b	4,09 ± 0,03b	4,23 ± 0,06a
Insaturados/saturados	1,50 ± 0,07a	1,59 ± 0,08a	1,56 ± 0,03a	1,58 ± 0,06a
Σ monoinsaturados	1,52 ± 0,04d	1,78 ± 0,05b	1,73 ± 0,05c	1,81 ± 0,05a
Σ Saturados e monoinsaturados	3,89 ± 0,02c	4,33 ± 0,03b	4,35 ± 0,02b	4,49 ± 0,01a
Σ Poliinsaturados	2,05 ± 0,02c	2,29 ± 0,03b	2,37 ± 0,02ab	2,42 ± 0,01a
Σ <i>n</i> -6 <sup>d</sup> PUFA	0,60 ± 0,04c	0,69 ± 0,02bc	0,79 ± 0,02ab	0,86 ± 0,02a
Σ <i>n</i> -3 <sup>e</sup> HUFA	0,78 ± 0,01b	0,87 ± 0,03ab	0,90 ± 0,02a	0,86 ± 0,02ab
DHA/EPA	0,45 ± 0,01a	0,38 ± 0,03a	0,36 ± 0,03a	0,36 ± 0,03a
HUFA/PUFA	1,30 ± 0,07a	1,26 ± 0,07ab	1,14 ± 0,01ab	1,00 ± 0,05b

Valores médios (± desvio padrão) para duas determinações. Médias seguidas na mesma linha por diferentes letras são estatisticamente diferentes (P<0,05). <sup>a</sup>Ácido eicosapentaenóico. <sup>b</sup>Ácido docosahexaenóico. <sup>c</sup>Metodologia de extração de Bligh e Dyer (1959). <sup>d</sup>Ácido graxo poliinsaturado. <sup>e</sup>Ácido graxo altamente poliinsaturado. nd: não detectado. Os ácidos graxos mais abundantes no corpo das pós-larvas estão indicados em negrito.

#### 4. DISCUSSÃO

A produtividade (PL L<sup>-1</sup>), a biomassa de PL e o índice de estágio larval (IEL) foram maiores nas larvas de *Macrobrachium rosenbergii* alimentadas com dietas contendo um nível de inclusão de 16% de lipídeo. A dieta com um nível de 12% de lipídeo apresentou o menor índice de estágio larval (IEL), indicando que esta retardou as mudas e a metamorfose em pós-larva, aumentando a porcentagem de larvas e diminuindo a produtividade (PL L<sup>-1</sup>) ao final da larvicultura. As dietas suplementadas com 16 e 20% de lipídeo tiveram maiores índices de condição larval (ICL), o que possivelmente mostrou que não houve efeitos destes níveis sobre os parâmetros avaliados por este índice.

Por outro lado, Kamarudin e Roustaian (2002), trabalhando com larvas de *M. rosenbergii*, relataram bons desempenhos produtivos utilizando um nível de inclusão de lipídeo na dieta de ~ 12,0%. Uma revisão recente sobre níveis dietéticos de lipídeo para larvas de crustáceos foi realizada por Holme et al (2009) (Tabela 6).

Tabela 6. Níveis lipídicos dietários usados em estudos nutricionais prévios em larvas de crustáceos.

Espécies	Lipídio Dietético	Referencia
<i>Penaeus monodon</i>	8%	Paibulkichakul et al. (1998)
<i>P. monodon</i>	18,2%	Kurmaly et al. (1989 <sup>a</sup> )
<i>P. monodon</i>	4,3%	Kurmaly et al. (1989 <sup>b</sup> )
<i>P. japonicus</i>	8-16,6%	Kanazawa et al. (1985)
<i>P. japonicus</i>	5,5%	Kanazawa et al. (1990)
<i>P. japonicus</i>	8,7%	Moe et al. (2004)
<i>P. indicus</i>	8,3-13,3%	Immanuel et al. (2003)
<i>P. vannamei</i>	11,5%	Pedroza-Islas et al. (2004)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	37,4%	Kovalenko et al. (2002)
<i>M. rosenbergii</i>	12,3-12,6%	Kamarudin e Roustaian (2002)
<i>Homarus americanus</i>	12-19%	Fiore e Tlusty (2005)
<i>Sylla serrata</i> (megalopa)	6%	Genodepa et al. (2004)

Adaptado de Holme et al. (2009)

O baixo desempenho produtivo das larvas que foram alimentadas com dieta inerte suplementada com 12% de lipídeo no nosso estudo, provavelmente possa ser explicado pelas maiores perdas na água, devidas a uma menor estabilidade das partículas da dieta, quiçá explicada pelo maior nível de inclusão de amido de milho nesta formulação, o que diminuiu a ingestão das larvas.

As análises de composição de ácidos graxos dos náuplios de *Artemia* mostraram que estes são uma boa fonte de ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3n-3), contrário ao encontrado nas dietas teste, que apresentam baixa concentração. Por outro lado, as dietas testes mostraram ser boas fontes do ácido docosahexaenóico (DHA), o qual foi adicionado nas dietas na forma de óleo de peixe, e que não foi detectado nos náuplios de *Artemia*. Outros ácidos, como o eicosadienóico (20:2), o eicosatrienóico (20:3n-3) e o araquidônico (20:4n-6), foram detectados nos náuplios de *Artemia*, mas não nas dietas teste, sendo que estes apareceram na carcaça das pós-larvas, o que mostra sua importância nutricional. Isto mostra a importância da co-alimentação ou alimentação conjunta, neste caso (dieta inerte + náuplios de *Artemia*), já que estes alimentos apresentam aporte diferenciado de nutrientes em termos de perfil lipídico.

Tem-se sugerido que altos níveis de lipídeo na dieta apresentam efeitos adversos no crescimento e sobrevivência de camarões (Briggs et al., 1994). Neste estudo, as pós-larvas alimentadas com níveis mais elevados de lipídeo não apresentaram diferenças nas taxas de sobrevivência, mas um decréscimo na produtividade, havendo maior porcentagem de larvas que não conseguiram atingir a metamorfose. Portanto, níveis de lipídeos acima de 16% devem aumentar o tempo de desenvolvimento larval. Outros estudos indicaram que níveis superiores a 10% de lipídeo na dieta não afetaram a sobrevivência nem o crescimento em juvenis de *M. rosenbergii* (Sheen e D'Abramo, 1991), *Penaeus schmitti* (Galindo et al., 1992), *Penaeus mododon* (Sheen et al., 1994) e *Penaeus indicus* (Shivaram e Raj, 1997). Nesta pesquisa, a dieta teste contendo um nível de inclusão de lipídeo de 15,83%, sendo 5,56% e 0,23% na forma PUFA e HUFA, respectivamente, mostrou as melhores respostas no desempenho produtivo. Neste mesmo nível de inclusão, os valores das somatórias ( $\Sigma$ ) de ácidos graxos saturados e insaturados (3,24 e 11,16%, respectivamente), foram menores do que nas dietas formuladas com 19,89 e 23,75% de lipídeo (3,80 e 14,30%, e, 4,35 e 17,26%, respectivamente) indicando possivelmente que o excesso de ácidos graxos poderia ter diminuído o desempenho produtivo das larvas *M. rosenbergii* alimentadas com estas dietas.

Por outro lado, Roustaian et al. (1999) avaliaram as mudanças na composição corporal de ácidos graxos durante o desenvolvimento larval de *M. rosenbergii*, e encontraram diminuição de 55,3 e 47,1% na composição do ácido linoléico (18:2n-6) e do ácido docosahexaenóico (22:6n-3) (DHA), respectivamente, entres as fases de zoea I

e zoea VIII/IX. Esta diminuição no conteúdo desses ácidos graxos na carcaça ao longo do desenvolvimento larval também tem sido documentada em *Penaeus japonicus* (Teshima e Kanazawa, 1982) e em larvas de outros crustáceos (Barnes, 1965). Esse fato pode ser explicado pela aproximação da metamorfose (larva→pós-larva) e posterior adaptação à vida bentônica, já que geralmente os indivíduos durante a fase larval planctônica apresentam maiores e mais variáveis conteúdos calóricos no corpo do que quando mudam para uma vida bentônica mais estável (Griffiths, 1977).

Poucos estudos avaliaram as exigências de ácidos graxos em larvas de crustáceos. No entanto, existem alguns trabalhos determinando exigências de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), ácidos graxos altamente poliinsaturados (HUFA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA). Takeuchi et al. (1999) determinaram para larvas do caranguejo *Portunus trituberculatus* uma exigência de 0,9-1,7% de HUFA. Kobayashi et al. (2000) determinaram uma exigência de 1,3-2,5% de EPA e 0,5% DHA, em larvas do caranguejo *Scylla paramamosain*. Em estudos mais recentes, também com caranguejos do gênero *Scylla*, Suprayudi et al., (2002) determinaram em larvas de *S. serrata* uma exigência de 0,8% de n-3HUFA e de 0,7-0,9% de EPA e 0,5-0,7% de DHA (Suprayudi et al., 2004).

Analisando o melhor tratamento (16% de lipídeo na dieta) no que diz respeito à composição corporal de ácidos graxos essenciais das PLs de *M. rosenbergii*, determinara-se a exigência de 0,7% de n-3PUFA, 0,9% de n-3HUFA, 0,6% de EPA e 0,2% de DHA. Analisando outras informações dos ácidos graxos essenciais presentes na carcaça das PLs no *M. rosenbergii*, pode-se determinar que as porcentagens de ácido linoléico (LA, 18:2n-6), ácido  $\alpha$ -linolênico (LNA, 18:3n-3) e EPA (20:5n-3) foram todas de 0,6%. No entanto, o DHA (22:6n-3) e o ácido araquidônico (AA, 20:4n-6) apresentaram porcentagens menores, de 0,2 e 0,07%, respectivamente, indicando a seguinte relação (LA=LNA=EPA>DHA>AA). Esta última relação é diferente daquela proposta por González-Baró e Pollero (1998) em exemplares adultos de *M. Borelli*, que observaram LNA>EPA e AA>DHA.

Analisando a composição em ácidos graxos dos náuplios de *Artemia*, da dieta inerte suplementada com 16% de lipídeo e da carcaça das pós-larvas suplementadas com a combinação destas fontes de alimento vivo e inerte, pode-se estabelecer que o ácido graxo mais abundante na carcaça das PLs foi o ácido oléico (26,1%); a *Artemia*

apresentou uma composição similar (25,8%), mas a dieta inerte mostrou valores mais altos deste ácido (33,3%). Por outro lado, o ácido palmítico e o EPA, tanto na *Artemia* quanto na dieta, apresentaram valores inferiores (11,9 e 1,6%; 16,6 e 0,9%, respectivamente) que na carcaça das pós-larvas (23,7 e 9,2%, respectivamente) mostrando que as duas fontes de alimento são deficientes como fontes destes ácidos. Quanto ao DHA (22:6 n-3), as pós-larvas apresentaram uma porcentagem na carcaça de 3,5%, sendo que na *Artemia* este ácido não foi detectado; já na dieta suplementada com 16% de lipídeo, foi determinada uma porcentagem de 2,2%, o que de fato mostra ainda uma baixa porcentagem quando comparada com o conteúdo da carcaça das PLs.

O sucesso obtido com a combinação dos náuplios de *Artemia* e o creme de ovos devem-se provavelmente ao caráter complementar desses alimentos. Os náuplios de *Artemia* são deficientes em ácido docosahexaenóico (22:6 n-3) que é suprido pela dieta inerte. Por outro lado, esta é pobre nos ácidos graxos: esteárico (18:0),  $\alpha$ -linolênico (18:3n-3) e araquidônico (20:4n-6), que são supridos pelos náuplios de *Artemia*. Isso explica as baixas sobrevivências e produtividades observadas em cultivos realizados somente com náuplios de *Artemia* ou com dieta inerte. Considerando a composição da carcaça das PL, as duas fontes de alimento são deficientes no ácido graxo eicosapentaenóico (20:5 n-3), nutriente que precisariam ser adicionados na dieta inerte.

Comparando os valores encontrados de lipídeo total e porcentagem de ácidos graxos na composição corporal das pós-larvas de *M. rosenbergii*, fica evidente neste estudo que as dietas inertes formuladas ainda estão longe de atender as exigências lipídicas desta espécie. Na realidade é que, mais importante do que a quantidade e variedade do lipídeo em termos de ácidos graxos essenciais é a porcentagem de inclusão deste nas dietas. Isto pode ser explicado pela co-alimentação com dieta inerte e náuplios de *Artemia*, já que juntos aportaram separadamente um perfil de ácidos graxos essenciais mais adequado ao desenvolvimento durante a fase larval.

Analisando os valores encontrados de lipídeo e perfil de ácidos graxos (AG) na composição corporal das pós-larvas de *M. rosenbergii*, fica evidente que as dietas inertes normalmente usadas na larvicultura de *M. rosenbergii*, (que foram usadas como referência para a definição das dietas testadas nesse trabalho), não atendem as exigências lipídicas ou ao perfil de AG para esta espécie. Embora os resultados indiquem que um nível de 16% de lipídio na dieta durante a larvicultura de *M.*

*rosenbergii* foi o nível mais adequado para aumentar a produtividade, valores mais baixos podem ser testados (8, 10, 12 e 14% de lipídeo) o que poderia ser suficiente se o perfil de ácidos graxos for mais adequado. Novos estudos precisam ser realizados para testar essas hipóteses. Por outro lado, futuros estudos devem ser desenvolvidos, para refinar os resultados desta pesquisa, pois precisam ainda ser definidas outras exigências, por exemplo, de fosfolipídios, entre eles principalmente a fosfatidilcolina (PC) e o fosfatidilinositol (PI), colesterol e o  $\beta$ -caroteno (precursor da vitamina A), os quais têm mostrado sua importância na área de nutrição de crustáceos.

## 5. AGRADECIMENTOS

Às relações bilaterais entre o governo da República Federativa do Brasil e da República da Colômbia, sob amparo do Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG-CAPES) pela bolsa de doutorado concedida para o primeiro autor, processo nº 0078042. Ao Professor Dalton José Carneiro pela ajuda na formulação das dietas experimentais. Nós também gostaríamos de agradecer à Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos do Laboratório Bioquímica de Microrganismos de Plantas do Departamento de Tecnologia - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal – SP, Brasil pela elaboração das análises de ácidos graxos.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION -APHA. 2005. Standard methods for the examination of water & wastewater. AWWA e WEF. 21 ed. Part. 2320, 2-27 p. Part. 4500-P, 4-416 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1998. Official Methods of Analysis of the AOAC International, 16th edition. AOAC International, Gaithersburg, M.D., USA.
- BARNES, H. 1965. Studies on the biochemistry of cirripede eggs. I. Changes in general biochemical composition during development of *Balanus balanoides* and *B. balanus*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 45: 321-329 p.
- BARROS, H.P., VALENTI, W.C. 2003. Ingestion rates of *Artemia* nauplii for different larval stages of *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 217, 223-233 p.

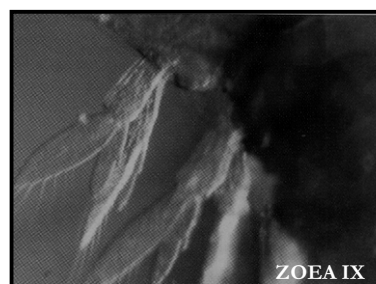
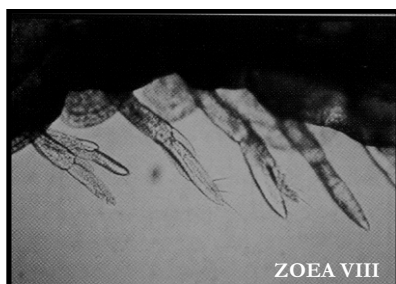
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal Biochemistry. v. 37. n.8. 911-917 p.
- BRIGGS, M.R., BROWN, J.H., FOX, C.J. 1994. The effect of dietary lipid and lecithin levels on the growth, survival feeding efficiency, production and carcass of postlarval *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture and Fisheries Management. 25: 279-294.
- CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture 200, 161-180 p.
- DANIELS, W.H.; D'ABRAMO, L.R.; DE PARSEVAL, L. 1992. Design and management of a closed, recalculating, "clear-water" hatchery system for freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Journal Shellfish Research. 11. 65-73.
- GALINDO, J., ALVAREZ, J.S., FRAGA, I., REYES, R., JAIME, B., FERNANDEZ, I. 1992. Requerimientos de lípidos en juveniles de camarón blanco *Penaeus schmitti*. Revista Cubana Investigaciones Pesqueras. 17(2): 23-36.
- GONZÁLEZ-BARÓ, M.R.; POLLERO, R.J. 1998. Fatty acid metabolism of *Macrobrachium borelli*: dietary origin of arachidonic and eicosapentaenoic acids. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 119A, No. 3, 747-752 p.
- GUERRERO-ALVARADO, C.E; VALENTI, W.C. 2009. Níveis de cálcio, fósforo, lipídeo e proteína na dieta inerte do camarão-da-malásia *Macrobrachium rosenbergii*, na fase larval. Capítulo II: Níveis dietéticos de cálcio e fósforo na fase larval de *Macrobrachium rosenbergii*. Tese de Doutorado, Unesp-Jaboticabal,SP. 108 p.
- GRIFFITHS, D. 1977. Caloric variation in crustacean and other animals. Journal of Animal Ecology 46: 593-605.
- HOLLAND, B. et al. 1994. McCance e Widdowson's the composition of foods. 4.ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food London, 8-9 p.
- HOLME, M.H.; ZENG, C.; SOUTHGATE, P.C. 2009. A review of recent progress toward development of a formulated microbound diet for mud crab, *Scylla serrata*, larvae and their nutritional requirements. Aquaculture 286, 164-175 p.
- HUNG, L.T., TUAN, N.A., CACOT, P., LAZARD, J. 2002. Larval rearing of Asian catfish, *Pangasius bocourti* (Siluroidei, Pangasiidae): alternative feeds and weaning time. Aquaculture 212, 115 – 127 p.
- KAMARUDIN, M.S.; ROUSTAIA, P. 2002. Growth and fatty acid composition of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, larvae fed diets containing various ratios of cod liver oil-corn oil mixture. Journal Applied Ichthyology. 18. 148-153p.
- KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, T.; ARAI, D.; SEKIYA, S. 2000. Suitable dietary levels of EPA and DHA for larval mud crab during *Artemia* feeding period. Nippon Suisan Gakkaishi, 66, 1006-1013 p.
- LAVENS, P., THONGROD, S., SORGELOOS, P. 2000. Larval prawn feeds and the dietary importance of *Artemia*. In: New, M.B., Valenti, W.C. (Eds.), Freshwater Prawn Culture: The farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Blackwell Science Ltd. Oxford-United Kingdom. 91-111 p.

- MANZI, J.J., MADDOX, M.B., SANDIFER, P.A., 1977. Algal supplement enhancement of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) larvicultura. Journal World Mariculture Society, 8, 207-223 p.
- PITIPORNCHAI, S. 1998. Experiment on rearing giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), larvae different feeds. Technical Paper No. 11/1998. Inland Fisheries Division. Departamento of Fisheries, Bangkok.
- SORGELOOS, P.; LEGER, P. 1992. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. Journal of the World Aquaculture Society. 23. 251-264 p.
- ROUSTAIAN, P., KAMARUDIN, M.S., OMAR, H., SAAD, C.R., AHMAD, M.H. 1999. Changes in fatty acid profile during the larval development of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture Research 30, 815-824 p.
- SHEEN, S.S., CHEN, S.J., HUANG, Y.S. 1994. Effect of dietary lipid levels on the growth response of tiger prawn, *Penaeus monodon*. Journal Fisheries Society, Taiwan 21(2): 205-213.
- SHEEN, S.S.; D'ABRAMO, L.R. 1991. Response of juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, to different levels of a cod liver oil/corn oil mixture in a semipurified diet. Aquaculture 93: 121-134.
- SHIVARAM, C.M., RAJ, R.P. 1997. Dietary lipid requirements of the juveniles of Indian white shrimp *Penaeus indicus*. H. Milne Edwards. Journal Aquaculture Tropics. 12(3): 165-180.
- SUPRAYUDI, M.A.; TAKEUCHI, T.; HAMASAKI, K.; HIROKAWA, J. 2002. The effect of n-3HUFA content in rotifers on the development and survival of mud crab, *Scylla serrata*, larvae. Suisanzoshoku, 50, 205-212 p.
- SUPRAYUDI, M.A.; TAKEUCHI, T.; HAMASAKI, K. 2004. Effects of *Artemia* enriched with eicosapentanoic and docosahexaenoic acid on survival and occurrence of molting failure in megalop larvae of the mud crab *Scylla serrata*. Fisheries Science, 70, 650-658 p.
- TAKEUCHI, T.; SATOH, N.; SEKIYA, S.; SHIMIZU, T.; WATANABE, T. 1999. The effect of dietary EPA and DHA on the molting rate of larval swimming crab *Portunus trituberculatus*. Nippon Suisan Gakkaishi, 65, 998-1004 p.
- TAYAMEN, M.; BROWN, J.H. 1998. A condition index for evaluating larval quality of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). Aquaculture Research, 30:917-922.
- TESHIMA, S.; KANAZAWA, A. 1982. Variation in lipid compositions during the larval development of the prawn (*Penaeus japonicus*). Memories of the Faculty of Fisheries, Kagoshima University 31: 205-212.
- UNO, Y., KWON, C.S. 1969. Larval development of *Macrobrachium rosenbergii* reared in the laboratory. Journal of the Tokyo University Fisheries. 55. 179-191 p.
- VALENTI, W.C.; DANIELS, W.H. 2000. Recirculation Hatchery Systems and Management. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C. (Eds.) Freshwater prawn culture: The farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Oxford, Blackwell Science. p. 69-90.
- VALENTI, W.C.; MALLASEN, M.; SILVA, C.A. 1998. Larvicultura em sistema fechado dinâmico. In: VALENTI, W.C. (Ed.) Carcinicultura de Água Doce: Tecnologia para a Produção de Camarões. Brasília., FAPESP/IBAMA. p. 112- 139.

# CAPÍTULO 4

## Artigo 3

### NÍVEIS DIETÉTICOS DE PROTEÍNA PARA A LARVICULTURA DE *Macrobrachium rosenbergii*



FONTE DAS FOTOS: TAKUJI FUJIMURA

## NÍVEIS DIETÉTICOS DE PROTEÍNA PARA A LARVICULTURA DE *Macrobrachium rosenbergii*

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado<sup>1</sup>, Wagner Cotroni Valenti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista/CAUNESP – Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

### RESUMO

A formulação de uma dieta inerte balanceada que atenda as exigências de proteína nas larvas de *Macrobrachium rosenbergii*, é importante para garantir melhor produtividade na larvicultura. Avaliou-se o efeito de diferentes níveis de proteína na dieta inerte sobre as principais variáveis de produção durante a larvicultura de *Macrobrachium rosenbergii*. Além disso, determinou-se o perfil de aminoácidos na carcaça dos animais, nos náuplios de *Artemia* e nas diferentes dietas. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro tratamentos, correspondentes a quatro níveis de proteína bruta (35, 40, 45 e 50%, em base seca) e quatro repetições. Dois dias após a eclosão, as larvas de todos os tratamentos foram alimentadas com quantidades crescentes de náuplios de *Artemia*. A partir do 11º dia (zoea VII), iniciou-se a co-alimentação, fornecendo-se as dietas-teste juntamente com os náuplios de *Artemia* até o final do cultivo. No 26º dia de cultivo, quando aproximadamente 90% das larvas metamorfosearam-se em pós-larvas (PL), realizou-se a despesca. Não houve diferença significativa na sobrevivência entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). Níveis de 45 e 50% de proteína bruta (PB) na dieta diminuíram a porcentagem de larvas ao final da larvicultura ( $P < 0,05$ ). A produtividade ( $PL L^{-1}$ ) foi significativamente maior no nível de 50% de PB. As maiores biomassas de PL produzidas foram encontradas nos tratamentos com 35, 45 e 50% e a menor no tratamento com 40% de PB. Os dados indicaram que 50% de PB na dieta durante a larvicultura apresenta-se como o nível mais adequado para a criação desta espécie. No entanto, níveis maiores não foram testados e poderiam condicionar resultados melhores, enquanto que níveis menores poderiam ser usados se o perfil de aminoácidos fosse otimizado.

**Palavras-chave:** camarão-da-malásia, larvicultura, proteína dietética, perfil de aminoácidos

## DIETARY LEVELS OF PROTEIN IN THE LARVAL PHASE OF *Macrobrachium rosenbergii*

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado<sup>1</sup>, Wagner Cotroni Valenti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista/CAUNESP – Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil.

### ABSTRACT

The effect of different levels of crude protein (CP) in the inert diet on the principal production variables was evaluated during *Macrobrachium rosenbergii* hatchery. In addition, the amino acid profile of carcass, *Artemia* nauplii and diets were determined. A randomized block experimental design with four treatments (35, 40, 45, 50% of crude protein, wet basis) and four replicates was used. Two days after hatching, the larvae were feed by increasing quantities of *Artemia* nauplii. From the 11<sup>th</sup> day on (zoea VII), co-feeding started, when diet-tests plus *Artemia* nauplii were supplied until the end of the rearing cycle. On the 26<sup>th</sup> day, when approximately 90% of the larvae turned into post larvae (PL), harvest was done. No significant differences ( $P>0.05$ ) were observed in the survival rates among treatments. Levels of 45 and 50% of CP in the inert diet significantly decreased the percentage of larvae at the end of the culture ( $P<0.05$ ). The productivity (PL L<sup>-1</sup>) was significantly higher at 50 % of CP. The higher final biomass of PL was found in the levels of 35, 45 and 50 % and the lower at 40% of CP Although 50 % of CP in the inert diet during hatchery was the most suitable level to reared this specie, higher levels was not tested and might be better. However, lower levels may be used if the amino acids profile was optimized.

**Keywords:** Giant River Prawn, Larviculture, Protein, Amino acid Profile

## NIVELES DIETÉTICOS DE PROTEÍNA PARA LA LARVICULTURA DE *Macrobrachium rosenbergii*

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado<sup>1</sup>, Wagner Cotroni Valenti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Estatal Paulista – UNESP, Centro de Acuicultura - CAUNESP, Jaboticabal, SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biología Aplicada a la Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias - FCAV, UNESP, CAUNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

### RESUMEN

La formulación de una dieta balanceada que atienda las exigencias de proteína en las larvas de *Macrobrachium rosenbergii*, es importante para garantizar mejor productividad al final de la larvicultura. Se evaluó el efecto de diferentes niveles de proteína en la dieta sobre las principales variables de producción durante la larvicultura de *Macrobrachium rosenbergii*. Además, se determinó el perfil de aminoácidos en el cuerpo de las postlarvas, náuplios de *Artemia* y en las diferentes dietas. El diseño experimental fue en bloques al azar, con cuatro tratamientos, correspondientes a cuatro niveles de proteína bruta (35, 40, 45 y 50%, em base seca) y cuatro repeticiones. Dos días después de la eclosión las larvas pasaron a ser alimentadas con cantidades crecientes de náuplios de *Artemia*. A partir del 11° día (zoea VII), se inició la alimentación conjunta, ofreciendo las dietas-teste acompañadas por los náuplios de *Artemia* hasta el final del ciclo de larvicultura. El 26° día de cultivo, cuando aproximadamente el 90% de las larvas se metamorfosearon en postlarvas (PL), se realizó la cosecha. No hubo diferencia significativa en la sobrevivencia entre los tratamientos ( $P > 0,05$ ). Niveles de 45 y 50% de proteína bruta (PB) en la dieta disminuyeron el porcentaje de larvas al final de la larvicultura ( $P < 0,05$ ). La productividad ( $PL L^{-1}$ ) fue significativamente mayor con el nivel de 50% de PB. Las mayores biomásas de PL producidas fueron encontradas en los tratamientos con 35, 45 y 50% y la menor en el tratamiento con 40% de PB. Los datos indicaron que 50% de PB en la dieta durante la larvicultura se presenta como el nivel mas adecuado para la cría de esta especie. Sin embargo, niveles mayores no fueron probados y podrían llevar a mejores resultados, mientras que niveles menores podrían ser usados si el perfil de aminoácidos fuese optimizado.

**Palabras clave:** Camarón Gigante de Malasia, larvicultura, perfil de aminoácidos, proteína dietética

## DES NIVEAUX DIÉTÉTIQUES DE PROTEINE POUR LA LARVECULTURE DE *Macrobrachium rosenbergii*.

Camilo Ernesto Guerrero Alvarado<sup>1</sup>, Wagner Cotroni Valenti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista/CAUNESP – Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FCAV, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

### RÉSUMÉ

La formulation d'un régime alimentaire équilibré que puisse répondre aux besoins de protéine des larves de *Macrobrachium rosenbergii* est très important pour assurer des meilleures productivités à la fin de la larveculture. L'effet de différents niveaux de protéine sur la diète inerte a été évalué sur les principaux variables de production tout au long de la larveculture de *Macrobrachium rosenbergii*. Des blocs aléatoires ont été choisis pour l'experimentation, avec quatre traitements qui correspondent à quatre niveaux de protéine brute (35, 40, 45 et 50%) et quatre répétitions. Deux jours après l'éclosion toutes les larves ont été nourries avec des quantités croissantes de nauplii d'*Artemia*. A partir du onzième jour (zoea VII), la coalimentation a été introduite en fournissant les diètes-teste en plus des nauplii d'*Artemia* jusqu'à la fin du cycle de larveculture. Au 26ème jour du cycle où 90% des larves, à peu près, se sont déjà méthamorphosées en pos-larves (PL), la récolte de fin d'élevage a été faite. Il n'y a pas eu de différence significatif sur la survie entre les traitements ( $P > 0,05$ ). Des niveaux de 45 et 50% de proteine brute (PB) dans la diète ont fait baisser le pourcentage de larves à la fin de la larveculture ( $P < 0,05$ ). La productivité (PL) a été beaucoup plus grande au niveau de 50% de PB. Les plus grandes biomasses de PL qu'ont été produites étaient dans les traitements avec 35, 45 et 50% et la moins grande dans le traitement avec 40% de PB. Les donnés indiquent que 50% de PB dans la diète au long de la larveculture est le niveau le meilleur pour l'élevage de cette espèce. Par ailleurs, des niveaux plus grands n'ont pas été testés, et peut-être qu'ils en donneraient des meilleurs réultats tandis que des niveaux plus bas en pourraient aussi être utilisés si le profil de aminoacides étaient optime.

**Mots clés:** Crevette géant d'eau douce; larviculture, protéine diététique, profil de aminoacides

## 1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de larvicultura do camarão-da-malásia *Macrobrachium rosenbergii* têm tido sucesso e melhorado nas três últimas décadas. No entanto, pesquisas sobre exigências nutricionais das larvas desta espécie ainda são escassas. A larvicultura comercial depende do uso de alimento vivo, basicamente náuplios de *Artemia*. Não obstante, o custo de produção e aquisição desses náuplios é muito alto (Cahu e Zambonino-Infante, 2001; Hung et al., 2002) e inconsistente nutricionalmente (Sorgeloss e Leger, 1992) fazendo-se necessária a alimentação conjunta com dieta artificial e náuplios de *Artemia* durante o processo de larvicultura. Daniels et al. (1992), Valenti et al. (1998) e Pitipornchai (1998) afirmaram que os náuplios de *Artemia* não contemplam as exigências nutricionais de *M. rosenbergii* nos últimos estágios larvais. Portanto, a disponibilidade de dieta artificial balanceada é necessária para melhorar os parâmetros produtivos durante o processo de criação e reduzir os custos operacionais (Kamarudin e Roustaian, 2002).

A dieta artificial atualmente utilizada durante a larvicultura de *M. rosenbergii* é um creme de ovo, conhecido como pudim, composto basicamente pela mistura de: ovo de galinha, molusco, peixe, leite em pó, farinha de trigo, óleo de soja e de peixe e um suplemento vitamínico-mineral. Esta dieta contém aproximadamente 45% de proteína, variando em diferentes países ou regiões, dependendo dos ingredientes e proporções utilizadas no preparo. Por exemplo, na Indonésia e Tailândia a porcentagem de proteína na dieta das larvas varia ao redor de 23% e 44%, respectivamente (Lavens et al., 2000). O conhecimento das exigências protéicas e do perfil de aminoácidos em larvas de *M. rosenbergii* durante a fase de zoea VII até o momento da metamorfose em pós-larva (PL) é importante para balancear a dieta. Com esta espécie de camarão de água doce, não existem trabalhos que avaliassem os possíveis efeitos de diferentes níveis de proteína na dieta sobre o desempenho produtivo. Por conseguinte, o objetivo da presente pesquisa foi determinar o nível mais adequado de proteína na dieta inerte, considerando como base o creme de ovos usado regularmente nas larviculturas, bem como a proporção dos principais aminoácidos essenciais encontrados na carcaça das pós-larvas de *M. rosenbergii*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Origem dos animais e condições experimentais

As larvas de *Macrobrachium rosenbergii* foram obtidas de fêmeas ovígeras capturadas nos viveiros do Setor de Carcinicultura do Centro de Aqüicultura da UNESP (Jaboticabal, SP, Brasil). As fêmeas, com peso médio de  $39,0 \pm 2,6$  gramas, foram desinfetadas em solução de formaldeído 25 ppm, por vinte minutos e, em seguida, transferidas para um tanque de eclosão com temperatura e salinidade da água variando de 29,9 a 30,6°C e 6,2 a 6,3‰, respectivamente. Larvas recém eclodidas (peso inicial  $\sim 27,4 \mu\text{g}$ ) foram coletadas, contadas e aclimatadas nos tanques de larvicultura em densidade de 80 larvas/L. Os oito tanques utilizados eram de cor preta, cilíndricos e de fundo cônico, com volume útil de 120 L, acoplados a biofiltros e operados em sistema fechado dinâmico (Valenti e Daniels, 2000). O volume do biofiltro correspondia a 25% do volume total do tanque de larvicultura. Utilizou-se cascalho de conchas de moluscos como substrato para as bactérias nos biofiltros. O fotoperíodo utilizado foi 13/11 (claro/escuro). As seguintes variáveis da água foram monitoradas diariamente: temperatura (°C), pH, salinidade (‰), condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Para a determinação destas variáveis foi usado uma sonda multiparâmetro (YSI – Modelo 63). A taxa de recirculação da água do tanque de larvicultura pelo biofiltro (%/dia) também foi monitorada diariamente. A alcalinidade foi medida uma vez por semana, segundo a metodologia da APHA (2005). A amônia ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) e o nitrito ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) foram monitorados quatro vezes por semana, usando testes colorimétricos da MERCK®. Os valores médios das variáveis de qualidade da água em todos os tratamentos foram: temperatura  $30,2 \pm 0,4^\circ\text{C}$ , pH  $8,02 \pm 0,14$ , salinidade  $12,09 \pm 0,09 \text{‰}$ , condutividade  $20,38 \pm 0,15 \mu\text{S}/\text{cm}$ , alcalinidade  $90,4 \pm 11,7 \text{ mg/L}$ , amônia  $15,8 \pm 4,7 \mu\text{g/L}$ , nitrito  $45,0 \pm 15,1 \mu\text{g/L}$  e taxa de recirculação da água de  $21,7 \pm 3,8 \text{ %/dia}$ . Estes valores foram mantidos dentro das faixas recomendadas por Valenti e Daniels (2000) para *M. rosenbergii*.

### 2.2. Alimentação das larvas e dietas experimentais

A partir das 48 horas após a eclosão e até o final da larvicultura (26 ° dia) as larvas dos diferentes tratamentos foram alimentadas diariamente ao entardecer (18h 30min)

com quantidades crescentes de náuplios de *Artemia* recém eclodidos (Tabela 1). Do dia 11° (Zoea VII) ao 25° dia foi feita a co-alimentação com dieta inerte.

Tabela 1. Tabela de alimentação usada durante a larvicultura de *M. rosenbergii*. Quantidades médias de cistos de *Artemia* utilizados para cada uma das quatro dietas experimentais.

Dias de cultivo	Estágios dominantes	Náuplios de <i>Artemia</i> /mL	Cistos de <i>Artemia</i> (g/día)
Povoamento	I	0,0	0
2	I-II	4,5	2,85
3	II-III	5,0	3,17
4	III	5,5	3,49
5	III-IV	5,5	3,49
6-7	IV-V	6,0	3,80
8	V	6,0	3,80
9-10	V-VI	6,0	3,80
11-12	VI-VII	7,0	4,44
13-14	VI-VII-VIII	8,0	5,07
15-18	VII-VIII-IX	9,0	5,71
19-21	VIII-IX	10,0	6,34
22-24	IX-X-XI	11,0	6,97
25-28	XI-PL	12,0	7,61

A taxa de eclosão média foi de 189.300 náuplios de *Artemia*/g de cistos

Foram utilizadas quatro dietas inertes com ~ 54% de umidade, contendo quatro diferentes níveis de proteína (35, 40, 45 e 50%). As dietas foram suplementadas com 1% de fósforo na forma de Fosfato de Sódio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), seguindo-se a recomendação de Guerrero-Alvarado e Valenti (2009, dados não publicados). Também foram suplementadas fontes de potássio (KCl) e de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), em porcentagem fixa de 1,10 e 0,18%, respectivamente, em cada um dos tratamentos. Todas as dietas formuladas foram isocalóricas (4.620 ± 68 kcal/kg de energia bruta) e isolipídicas (15,9 ± 0,1 % de extrato etéreo). O nível de 16% lipídeos foi suplementado seguindo-se a recomendação de Guerrero-Alvarado e Valenti (2009, dados não publicados). Foram utilizadas duas fontes de lipídeo nas dietas: o óleo de peixe (OP) e o óleo de milho (OM), mantendo-se uma relação OP:OM de 2:1. Para manter todas as dietas isocalóricas foi utilizado como fonte de energia o amido de milho, em proporções decrescentes na medida em que aumentavam-se os níveis de proteína. Para variar as porcentagens de proteína nas dietas foi utilizado concentrado protéico de soja (Soycomil<sup>®</sup>). A formulação e composição proximal das dietas experimentais e dos náuplios de *Artemia* são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Ingredientes e composição química das dietas experimentais utilizadas durante a larvicultura de *M. rosenbergii*.

<i>Ingredientes (% base úmida)</i>	<b>Níveis de proteína bruta (%)</b>			
	<b>35</b>	<b>40</b>	<b>45</b>	<b>50</b>
Clara de ovo de galinha	34,07	34,07	34,07	34,07
Filé de tilápia	19,14	19,14	19,14	19,14
Lula	16,27	16,27	16,27	16,27
<b>Concentrado protéico de soja<sup>a</sup></b>	<b>2,62</b>	<b>5,70</b>	<b>8,90</b>	<b>11,49</b>
Gema de ovo de galinha	7,85	7,85	7,85	7,85
Leite em pó <sup>b</sup>	3,41	3,41	3,41	3,41
Farinha de trigo <sup>c</sup>	1,69	1,69	1,69	1,69
<b>Amido de milho<sup>d</sup></b>	<b>8,86</b>	<b>5,78</b>	<b>2,58</b>	<b>0,00</b>
Óleo de peixe <sup>e</sup>	1,78	1,78	1,78	1,78
Óleo de milho <sup>f</sup>	0,89	0,89	0,89	0,89
Suplemento vitamínico-mineral <sup>g</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00
Vitamina C <sup>h</sup>	0,15	0,15	0,15	0,15
KCl <sup>i</sup>	1,10	1,10	1,10	1,10
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>j</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O <sup>k</sup>	0,18	0,18	0,18	0,18
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
(%) de umidade	52,61	53,73	54,89	55,00

*Composição analisada (100% MS)*

<b>Proteína bruta (PB)</b>	<b>34,9 ± 0,1</b>	<b>40,1 ± 0,1</b>	<b>45,3 ± 0,1</b>	<b>49,6 ± 0,1</b>
Extrato etéreo (EE)	15,8 ± 0,1	15,9 ± 0,1	15,9 ± 0,1	16,0 ± 0,1
Fibra bruta (FB)	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Matéria mineral (MM)	9,3 ± 0,2	9,8 ± 0,2	10,2 ± 0,2	10,6 ± 0,2
Extrato não nitrogenado (ENN)	39,3 ± 0,5	33,3 ± 0,5	27,3 ± 0,5	22,3 ± 0,5
<b>Carboidratos (CHO)<sup>l</sup></b>	<b>40,0 ± 0,4</b>	<b>34,2 ± 0,4</b>	<b>28,6 ± 0,4</b>	<b>23,0 ± 0,4</b>
Energia bruta (EB) (kcal/kg)	4.539,9	4.601,4	4.638,8	4.701,7
<b>Relação energia:proteína (kcal/g)</b>	<b>13,0:1,0</b>	<b>11,5:1,0</b>	<b>10,2:1,0</b>	<b>9,5:1,0</b>

<sup>a</sup>Soycomil® K. <sup>b</sup>Nestle®: composição em (100g): K 1,26g; Ca 0,97g; P 0,72g; Na 0,33g; Mg 0,08g; ácido pantotênico 2,77mg; riboflavina 1,38 mg; cobalamina 2,62µg. <sup>c</sup>Nita®: composição em (100g): Ca 18mg; Ferro 1,2 mg. <sup>d</sup>Maizena® composição em (100 g): carboidratos 85 g. <sup>e</sup>Herbarium® composição em (1 g): EPA 0,2 g, DHA 0,1 g. <sup>f</sup>Liza® composição em (100 g): ácido linoléico 47,50 g, ácido oléico 35,37 g, ácido palmítico 12,42 g, ácido esteárico 1,92 g, ácido linolênico 1,66, outros 1,11 g; Vitamina E 16,6 mg. <sup>g</sup>Premix vitamínico-mineral Fri-Ribe (mg/100 g): vitamina B<sub>1</sub> 3,0; vitamina B<sub>2</sub> 2,5; vitamina B<sub>6</sub> 3,5; vitamina B<sub>12</sub> 4,0; vitamina C 15,0; vitamina E 15,0; vitamina K 0,3; vitamina A 1000,0 IU, vitamina D 300,0 UI; ácido fólico 0,4; ácido pantotênico 5,0; Colina 40,0; Biotina 0,1; Niacina 10,0; Zn 15,0; Cu 5,0; Mn 4,0; Fe 2,0; I 0,15; Cr 0,06; Co 0,03; Se 0,03; antioxidante 10,0. <sup>h</sup>Vit. C (ácido *L*-ascórbico-2-polifostato). <sup>i</sup>KCl (JT Baker). <sup>j</sup>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth). <sup>k</sup>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Mallinckrodt, Chemicals), <sup>l</sup>Carboidrato = extrativo não nitrogenado (ENN) + fibra bruta (FB).

Os ingredientes das dietas foram pesados individualmente e moídos em moinho (IKA modelo A11 Basic) e posteriormente combinados com os ingredientes úmidos em liquidificador. A pasta homogênea resultante foi transferida para uma forma de alumínio e cozida em banho-maria fervente por aproximadamente 30 minutos a uma temperatura máxima de 55°C. Após resfriamento, as dietas foram divididas em porções suficientes para um dia de alimentação. Essas porções foram armazenadas em sacos plásticos a - 20°C (Valenti et al., 1998). A quantidade diária fornecida ao longo da larvicultura variou da seguinte forma: 41,75 mg/L do 11° ao 12° dia, 50,0 mg/L do 13° ao 18° dia, 60 mg/L do 19° ao 21° dia e 70 mg/L do 22° ao 25° dia (Valenti et al., 1998). Estas quantidades foram divididas em três refeições ao longo do dia e ofertadas às 08h, 13h e 18h. Antes do fornecimento, as dietas passavam por peneiras de 250 µm (11° e 12° dias), 425 µm (13° ao 21° dia) e 710 µm (22° ao 25° dia). Posteriormente eram distribuídas manualmente em seus respectivos tratamentos. A cada dois dias era realizada a sifonagem dos tanques para retirada de resíduos de alimento, fezes e larvas mortas.

### 2.3. Composição química

A composição dos ingredientes das quatro dietas foi analisada conforme a metodologia descrita pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1998). O teor de matéria seca (MS) foi determinado submetendo-se as amostras à secagem em estufa a 105°C por 16 horas. O teor de proteína bruta (PB) foi calculado pelo conteúdo de nitrogênio total, determinado pelo método de Kjeldahl e multiplicado pelo fator 6,25. O extrato etéreo (EE) foi analisado após extração em Soxhlet, tendo como solvente o éter de petróleo (p.e. 30 – 60°C), com refluxo contínuo através da amostra, durante 5 horas. O conteúdo de fibra bruta (FB) foi obtido a partir das amostras secas e desengorduradas, submetidas à digestão ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1,25%) e básica (NaOH – 1,25%) durante 30 minutos por digestão, e posterior queima do resíduo em mufla, a 500 °C. A concentração de matéria mineral (MM) foi determinada carbonizando-se as amostras em mufla a 600°C por 4 horas. O teor de extrativo não nitrogenado (ENN) foi obtido subtraindo da matéria seca o total de nutrientes analisados. A determinação da energia bruta (EB) foi realizada em bomba calorimétrica de Parr (modelo 1281). Todas

as análises foram realizadas em triplicata, com exceção da energia bruta (EB), a qual foi determinada em uma única análise.

### 2.3.1 Análises de aminoácidos livres e totais

Amostras secas de ração, náuplios de *Artemia*, larvas (zoea VII) e pós-larvas inteiras com peso médio de  $8,9 \pm 1,2$  mg, foram colocadas em tubos Eppendorf e homogeneizadas com pó de vidro e 100  $\mu$ L de água destilada por  $\sim 5$  min. Os homogeneizados foram centrifugados a 3.300 rpm (Fanem Excelsa II, Modelo 206R) por 30 min, sedimentando os restos celulares e o pó de vidro. O sobrenadante foi retirado com pipeta automática e rapidamente transferido para outro tubo Eppendorf, e seu volume completado com água destilada para 100  $\mu$ L. Os homogeneizados foram conservados em freezer a  $-25^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

Os aminoácidos livres e os ligados a proteínas das amostras homogeneizadas de dieta artificial, náuplios de *Artemia*, carcaça das larvas e pós-larvas foram derivados com fenilisotiocianato (PITC) (Bidleingmeyer et al., 1987) e separados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Nesse sistema, os aminoácidos das amostras reagem com o fenilisotiocianato (PITC) na presença de uma base orgânica (triethylamina, TEA) produzindo aminoácidos feniltiocarbamila-derivados no seu grupo amino. Estes são separados pela HPLC operada em fase-reversa, e detectados e quantificados em 254 nm. Para a análise dos aminoácidos livres as proteínas das amostras foram extraídas com etanol 80% e ácido  $\alpha$ -aminobutírico

Para a análise dos aminoácidos ligados a proteínas (aminoácidos totais) as amostras foram hidrolisadas com vapor de ácido clorídrico 6N e fenol 0,1% à temperatura de  $110^{\circ}\text{C}$  por 22 horas. A injeção das amostras e a integração dos picos correspondentes às concentrações de aminoácidos foram feitas automaticamente. Esse sistema permite a identificação e quantificação de todos os aminoácidos comuns com exceção da asparagina que elui próxima à serina, sendo quantificada como tal; glutamina que se comporta como glicina; e triptofano que não pode ser quantificado pois coelui com produtos de degradação. Os dados são expressos em nanomoles de aminoácido por miligrama de peso seco ou como porcentagem de aminoácidos por grama de proteína. Os perfis de aminoácidos livres, ligados a proteínas e totais das dietas experimentais e dos náuplios de *Artemia* utilizados na alimentação das larvas são apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Composição de aminoácidos livres, ligados a proteínas e totais (g/100g de proteína) das dietas experimentais e dos náuplios de *Artemia*.

Aminoácidos	Livres					Ligados a proteínas					Totais				
	% de proteína da dieta					% de proteína da dieta					% de proteína da dieta				
	35	40	45	50	<sup>a</sup> Náuplios	35	40	45	50	<sup>a</sup> Náuplios	35	40	45	50	<sup>a</sup> Náuplios
<sup>b</sup> AANE															
Arginina	0,01	0,01	0,00	0,01	0,13	1,14	1,19	1,49	1,68	0,96	1,15 <sup>c</sup>	1,20 <sup>c</sup>	1,49 <sup>b</sup>	1,69 <sup>a</sup>	1,09 <sup>c</sup>
Histidina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,35	0,72	0,86	1,09	1,12	0,35 <sup>c</sup>	0,72 <sup>bc</sup>	0,86 <sup>ab</sup>	1,09 <sup>ab</sup>	1,20 <sup>a</sup>
Isoleucina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	2,09	1,72	1,86	1,98	2,51	2,09 <sup>b</sup>	1,72 <sup>b</sup>	1,86 <sup>b</sup>	1,98 <sup>b</sup>	2,69 <sup>a</sup>
<b>Leucina</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	1,95	2,88	3,08	3,37	3,60	<b>1,95<sup>b</sup></b>	<b>2,89<sup>a</sup></b>	<b>3,08<sup>a</sup></b>	<b>3,37<sup>a</sup></b>	3,90 <sup>a</sup>
<b>Lisina</b>	0,01	0,00	0,00	0,00	0,31	3,72	3,77	4,26	4,86	6,85	<b>3,73<sup>c</sup></b>	<b>3,77<sup>c</sup></b>	<b>4,26<sup>c</sup></b>	<b>4,86<sup>b</sup></b>	7,16 <sup>a</sup>
Metionina	0,02	0,02	0,01	0,01	0,07	1,35	1,70	2,25	2,08	1,31	1,36 <sup>b</sup>	1,72 <sup>ab</sup>	2,27 <sup>a</sup>	2,08 <sup>ab</sup>	1,38 <sup>ab</sup>
Fenilalanina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	1,60	1,64	1,81	1,98	1,80	1,61 <sup>c</sup>	1,64 <sup>c</sup>	1,81 <sup>b</sup>	1,98 <sup>a</sup>	1,95 <sup>a</sup>
Treonina	0,01	0,01	0,00	0,00	0,17	1,32	1,72	1,94	2,23	2,87	1,33 <sup>d</sup>	1,72 <sup>c</sup>	1,95 <sup>c</sup>	2,23 <sup>b</sup>	3,04 <sup>a</sup>
<b>Valina</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26	2,09	2,40	2,62	2,88	3,63	<b>2,09<sup>e</sup></b>	<b>2,41<sup>d</sup></b>	<b>2,63<sup>c</sup></b>	<b>2,88<sup>b</sup></b>	3,90 <sup>a</sup>
<b>Σ</b>	<b>0,06</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	<b>1,65</b>	<b>15,61</b>	<b>17,75</b>	<b>20,17</b>	<b>22,15</b>	<b>24,65</b>	<b>15,67<sup>d</sup></b>	<b>17,80<sup>c</sup></b>	<b>20,20<sup>b</sup></b>	<b>22,17<sup>b</sup></b>	<b>26,30<sup>a</sup></b>
<sup>c</sup> AANE															
Ácido aspártico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	2,51	3,04	3,76	4,66	3,81	2,51 <sup>d</sup>	3,05 <sup>c</sup>	3,76 <sup>b</sup>	4,66 <sup>a</sup>	3,90 <sup>b</sup>
Serina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	1,88	2,24	2,58	2,88	3,14	1,88 <sup>e</sup>	2,25 <sup>d</sup>	2,58 <sup>c</sup>	2,88 <sup>b</sup>	3,32 <sup>a</sup>
Ácido glutâmico	0,01	0,01	0,01	0,00	0,19	5,05	6,29	6,83	7,78	6,52	5,06 <sup>d</sup>	6,30 <sup>c</sup>	6,84 <sup>b</sup>	7,79 <sup>a</sup>	6,70 <sup>b</sup>
Prolina	0,01	0,01	0,00	0,00	0,14	1,18	1,39	1,44	1,63	2,44	1,19 <sup>c</sup>	1,40 <sup>c</sup>	1,45 <sup>c</sup>	1,64 <sup>b</sup>	2,58 <sup>a</sup>
Glicina	0,03	0,03	0,02	0,01	0,18	4,16	4,82	5,51	5,29	5,26	4,19 <sup>c</sup>	4,85 <sup>b</sup>	5,53 <sup>a</sup>	5,31 <sup>ab</sup>	5,44 <sup>a</sup>
Alanina	0,01	0,01	0,01	0,00	0,57	2,81	3,40	3,62	3,82	6,19	2,83 <sup>e</sup>	3,41 <sup>d</sup>	3,62 <sup>c</sup>	3,82 <sup>b</sup>	6,76 <sup>a</sup>
Cistina	nd	0,00	nd	0,00	0,01	0,49	0,16	0,18	0,20	0,28	0,49 <sup>a</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,29 <sup>a</sup>
Tirosina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,87	0,64	0,72	0,79	1,16	0,87 <sup>a</sup>	0,64 <sup>a</sup>	0,72 <sup>a</sup>	0,79 <sup>a</sup>	1,32 <sup>a</sup>
Taurina	0,01	0,01	0,01	0,00	0,06	0,20	0,23	0,40	0,34	0,62	0,21 <sup>c</sup>	0,24 <sup>bc</sup>	0,41 <sup>b</sup>	0,35 <sup>bc</sup>	0,69 <sup>a</sup>
<b>Σ</b>	<b>0,07</b>	<b>0,08</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>1,57</b>	<b>19,16</b>	<b>22,22</b>	<b>25,05</b>	<b>27,40</b>	<b>29,43</b>	<b>19,23<sup>d</sup></b>	<b>22,30<sup>d</sup></b>	<b>25,10<sup>c</sup></b>	<b>27,43<sup>b</sup></b>	<b>31,00<sup>a</sup></b>
Proteína total (%)	0,13	0,13	0,08	0,05	3,22	34,77	39,97	45,22	49,55	54,08	<b>34,90<sup>c</sup></b>	<b>40,10<sup>d</sup></b>	<b>45,30<sup>c</sup></b>	<b>49,60<sup>b</sup></b>	<b>57,30<sup>a</sup></b>
Relação: AAE/AANE	0,82:1	0,66:1	0,72:1	0,67:1	1,05:1	0,80:1	0,80:1	0,81:1	0,81:1	0,84:1	0,80:1	0,80:1	0,81:1	0,81:1	0,85:1

<sup>a</sup>Grupo INVE, Bélgica. nd: não detectado. <sup>b</sup>AAE: aminoácidos essenciais. <sup>c</sup>AANE: aminoácidos não essenciais. Os aminoácidos totais essenciais mais abundantes nas dietas estão indicados em negrito. Médias seguidas na mesma linha por diferentes letras são estatisticamente diferentes (P<0,05).

### 2.3.2 Ensaio das enzimas digestivas

Os ensaios enzimáticos nas pós-larvas foram realizados em triplicata para cada nível de proteína testado. As pós-larvas foram agrupadas em pools e homogeneizadas em tampão fosfato 20 mm, pH 7,0 com 50% de glicerol (tampão de homogeneização) com três “*strokes*” de 20 seg., sob banho de gelo. Após a homogeneização, o material foi centrifugado por 5 min a 10.000 x g e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima. As atividades enzimáticas foram expressas como atividade total em unidades internacionais (UI) pós-larva<sup>-1</sup> e/ou UI mg<sup>-1</sup> de proteína, sendo 1,0 UI equivalente a 1.0 mmol de substrato consumidos por minuto.

#### 2.3.2.1 Amilase

A atividade amilohidrolítica foi avaliada segundo o método proposto por Bernfeld (1955) modificado. Na mistura de reação contendo 1,0 mL de solução de amido 5% em tampão Citrato/Fosfato 0,2M (pH 7,0) e 0,5 mL de solução de NaCl 0,5% como cofator enzimático, foi adicionado um volume adequado de homogeneizado celular. A reação foi incubada a 25°C por 30 minutos e interrompida com 1,0 mL de solução 5% ZnSO<sub>4</sub> : Ba(OH)<sub>2</sub> 0,3 N. Posteriormente, a mistura de reação foi centrifugada a 11.000 xg por 3 minutos. A atividade específica foi expressa como μmoles de açúcares redutores totais por minuto (U) por mg de proteína (UI).

#### 2.3.2.2 Tripsina

A atividade de tripsina foi avaliada seguindo a metodologia de Hummel (1959) modificado. Utilizou-se como substrato 1,04 mM de TAME (α-p-Toluenesulphonyl-L-arginine methyl ester hydrochloride) em solução tampão 0,01 M CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O/0,2 M Tris/HCL, pH 8,1. Uma alíquota ajustada de homogeneizado celular foi utilizada como fonte enzimática. A temperatura de reação era de 25°C e a densidade óptica foi registrada em 247 nm após 20 segundos de reação. A atividade específica da enzima foi expressa em μmol de arginina por minuto (U) por mg de proteína (U/mg proteína):

#### 2.3.2.3 Protease inespecífica

Para os ensaios da atividade proteolítica inespecífica foi utilizado o método de hidrólise da caseína, adaptado de Walter (1984). Os valores adequados de pH para as

determinações em cada amostra foram previamente determinados. A mistura de reação era composta por tampão em pH adequado (500 µL), caseína 1% (500µL) como substrato e alíquota previamente ajustada do homogeneizado como fonte de enzima. Após 60 minutos de incubação a 25°C, a reação era paralisada com 500 µL de TCA 15% (ácido tricloroacético), mantida em gelo fundente por ~ 30 minutos e o precipitado removido por centrifugação a 14.400 x g por 3 minutos para leitura do sobrenadante em 280 nm. Todas as amostras foram realizadas em triplicata e, paralelamente, dois brancos, um de enzima (onde a quantidade de enzima era substituída por água destilada) e outro de substrato (onde o substrato era substituído por água destilada), passando pelos mesmos procedimentos dos tubos de reação. Tirosina foi utilizada como padrão e uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1µg de tirosina, por minuto (U), expressa por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

#### 2.4. Variáveis de produção na larvicultura

O final da larvicultura ocorreu no 26º dia, quando aproximadamente 90% das larvas dos melhores tratamentos metamorfosearam-se em pós-larvas (PL). Os tanques de larvicultura foram esvaziados e as larvas e pós-larvas (PL) coletadas e contadas individualmente. Foram determinadas as seguintes variáveis de produção: porcentagem de sobrevivência total, porcentagem de larvas e pós-larvas (%PL), peso seco final, biomassa de PL e a produtividade (PL L<sup>-1</sup>). Para determinar o peso seco final, 50 PL de cada tanque foram lavadas em água destilada, secas em papel de filtro e transferidas para cartuchos de papel alumínio previamente pesados (5 PL/cartucho). Os cartuchos foram levados à estufa com sistema de circulação (Nova Ética) mantendo a temperatura em 55°C, por 48 h. Logo após, os cartuchos foram transferidos para um dessecador e, após duas horas, pesados em balança analítica (Mettler Toledo AT21, precisão de 1 µg). A biomassa em PL foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Biomassa em PL (g)} = (\text{n}^\circ \text{ de PL final} \times \text{peso seco final médio (mg)}) / 1000$$

#### 2.4.1. Índice de estágio larval (IEL)

Para a avaliação do efeito dos níveis de proteína bruta no decorrer do desenvolvimento larval, amostras de 10 larvas de cada tanque de cultivo foram examinadas a cada três dias sob microscópio invertido (Olympus CKX41) para observação do estágio larval. O índice de estágio larval (IEL) foi determinado de acordo com o método da média ponderada de Manzi et al. (1977) segundo a fórmula:

$$IEL = \frac{\sum ni.E}{n}$$

Sendo:

$n_i$  = nº de larvas no estágio E;

E = estágio de desenvolvimento, variando de I a XI;

n = nº de unidades da amostra.

Os doze estágios larvais foram identificados segundo as descrições de Uno e Kwon (1969). As pós-larvas recém metamorfoseadas (Zoea XII) não foram consideradas para os cálculos de índice de estágio larval.

#### 2.4.2. Índice de condição larval (ICL)

O índice de condição larval (ICL) foi verificado segundo a planilha desenvolvida por Tayamen & Brown (1998) para *M. rosenbergii*. Os itens analisados foram: condições do intestino, condições do hepatopâncreas, estado dos cromatóforos, coloração do corpo, estado do rostro e cerdas, proporção da musculatura em relação ao intestino, aparência do músculo do abdome, melanização e presença de organismos infestantes. O índice de condição larval (ICL) foi determinado de acordo com a fórmula:

$$IC = \frac{\sum P}{10n}$$

Sendo P = total de pontos; n = nº da amostra.

## 2.5. Delineamento experimental e análise dos dados

Utilizou-se um delineamento experimental em blocos casualizados temporais, com quatro tratamentos (35, 40, 45 e 50% de proteína na dieta) e quatro repetições. Os valores expressos em porcentagens foram previamente transformados em arco seno  $\sqrt{x/100}$ . As seguintes variáveis de produção foram submetidas à Análise de Variância: % de sobrevivência total, % de larvas, % de pós-larvas, peso seco final (mg), biomassa em pós-larvas (g), produtividade (PL L<sup>-1</sup>) e os índices de estágio larval e condição larval que foram avaliados no dia anterior a despesca. Os dados foram submetidos à análise da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov e de homocedasticidade pelo teste Brown-Forsythe. Quando encontradas diferenças significativas nas variáveis de produção (P<0,05), as médias dos tratamentos foram comparadas com o teste de Tukey ou de Duncan, tendo-se em conta o coeficiente de variação encontrado. Consideraram-se médias diferentes quando P<0,05. As análises estatísticas foram realizadas no “*Statistical Analysis System*” (SAS Institute Inc., version 9.0).

## 3. RESULTADOS

As respostas de crescimento das larvas de *M. rosenbergii* alimentadas por 15 dias com dieta inerte contendo diferentes níveis de proteína bruta (PB) são apresentadas na Tabela 4. A sobrevivência não diferiu significativamente entre os tratamentos (P>0,05). As larvas alimentadas com 45 e 50% de proteína na dieta tiveram porcentagens de larvas significativamente menores quando comparadas com as dietas de 35 e 40% de proteína. Níveis de 50% de proteína na dieta aumentaram significativamente a produtividade (PL L<sup>-1</sup>) (Tabela 4). Os indivíduos alimentados com nível 35% de proteína apresentaram valores de peso seco, estatisticamente maiores quando comparadas com as pós-larvas dos outros tratamentos (P<0,05). As maiores biomassas de pós-larvas foram encontradas nos tratamentos com 35, 45 e 50% de proteína, diferindo significativamente (P<0,05) do tratamento com 40% de proteína. Os maiores índices de estágio larval (IEL) foram encontrados nos tratamentos com níveis de 40, 45 e 50% de inclusão de proteína, diferindo estatisticamente (P<0,05) do tratamento com 35%. O índice de condição larval (ICL) foi menor no tratamento com nível de 35% de proteína. A maior deposição de proteína na carcaça das pós-larvas foi observada nos indivíduos alimentados com níveis de 40 e 45% de proteína, diferindo

significativamente dos tratamentos suplementados com níveis de 35 e 50% de proteína, como se observa na Tabela 4 e 6.

O aumento no nível de proteína nas dietas inertes testadas resultou em diminuição na porcentagem do extrativo não nitrogenado (ENN), dos carboidratos (CHO) e também da relação energia/proteína (EB/PB). Assim, as dietas com 35, 40, 45 e 50% de proteína bruta tiveram 39,3; 33,3; 27,3 e 22,3% de ENN e 40,0; 34,2; 28,6 e 23,0% de CHO, respectivamente (Tabela 2). A relação EB/PB também diminuiu com o aumento nos níveis de proteína (13,0:1,0; 11,5:1,0; 10,2:1,0 e 9,5:1,0).

A maior atividade aminolítica foi encontrada na dieta com nível de 40% de proteína, diferindo significativamente ( $P < 0,05$ ) das demais dietas (Tabela 5). A maior atividade de tripsina foi encontrada no tratamento suplementado com nível de 50% de proteína, diferindo significativamente ( $P < 0,05$ ) dos outros tratamentos. Na dieta inerte com nível de 45% de proteína bruta foi determinada a maior atividade de protease inespecífica, e esta diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) dos outros níveis.

Tabela 4. Efeito de diferentes níveis de proteína bruta nos parâmetros de crescimento de *M. rosenbergii*, sobre a sobrevivência, a porcentagem de larvas, a produtividade, o peso seco, a biomassa de PL, o índice de estágio larval, o índice de condição larval e a deposição de proteína na carcaça das pós-larvas.

Parâmetro de crescimento	Nível de proteína bruta (%)			
	35	40	45	50
Sobrevivência (%)	63,75 ± 5,95 <sup>a</sup>	65,59 ± 7,28 <sup>a</sup>	64,37 ± 2,21 <sup>a</sup>	71,63 ± 2,18 <sup>a</sup>
Larvas (%)	10,69 ± 3,72 <sup>a</sup>	6,83 ± 2,22 <sup>a</sup>	2,26 ± 1,50 <sup>b</sup>	1,24 ± 0,75 <sup>b</sup>
Produtividade (PL L <sup>-1</sup> )	42,45 ± 4,26 <sup>c</sup>	47,01 ± 5,65 <sup>bc</sup>	49,69 ± 2,79 <sup>b</sup>	56,31 ± 2,34 <sup>a</sup>
Peso seco (mg)	2,32 ± 0,33 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,40 <sup>c</sup>	1,93 ± 0,42 <sup>b</sup>	1,75 ± 0,53 <sup>bc</sup>
Biomassa PL (g)	11,72 ± 1,40 <sup>a</sup>	9,67 ± 2,27 <sup>b</sup>	11,86 ± 3,16 <sup>a</sup>	11,68 ± 3,27 <sup>a</sup>
IEL	10,8 ± 0,2 <sup>c</sup>	11,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	11,6 ± 0,1 <sup>ab</sup>	11,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
ICL	1,8 ± 0,0 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,0 <sup>a</sup>
Proteína carcaça (%)	66,10 ± 0,05 <sup>b</sup>	68,40 ± 0,06 <sup>a</sup>	68,01 ± 0,04 <sup>a</sup>	66,31 ± 0,03 <sup>b</sup>

Dados médios (± desvio padrão) para quatro determinações. Médias seguidas na mesma linha por diferentes letras são diferentes ( $P < 0,05$ ).

Tabela 5. Atividade das enzimas digestivas amilase, tripsina e protease das pós-larvas de *M. rosenbergii*, alimentadas com diferentes níveis de proteína na dieta.

Enzimas digestivas	Nível de proteína bruta (%)			
	35	40	45	50
Atividade amilolítica ( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$ )	$3,48 \pm 1,02^b$	$5,85 \pm 0,12^a$	$2,49 \pm 0,67^c$	$3,26 \pm 0,43^b$
Atividade de tripsina ( $^{13}\text{U}/\text{mg}/\text{proteína}$ )	$0,03 \pm 0,00^b$	$0,03 \pm 0,00^b$	$0,00 \pm 0,00^c$	$0,05 \pm 0,00^a$
Atividade proteolítica inespecífica ( $\text{U}/\text{mg}/\text{proteína}$ )	$0,00005 \pm 0,0^c$	$0,00009 \pm 0,0^b$	$0,00014 \pm 0,0^a$	$0,00003 \pm 0,0^c$

Dados médios ( $\pm$  desvio padrão) para três determinações. Médias seguidas na mesma linha por diferentes letras são diferentes ( $P < 0,05$ ).

Os aminoácidos livres essenciais mais abundantes na carcaça das pós-larvas foram: a lisina, a arginina, a leucina, a valina e a treonina (Tabela 6), já nas larvas zoea VII os que estiveram em maiores concentrações foram: a lisina, leucina, arginina e isoleucina. Nos tratamentos com 40, 45 e 50% de proteína bruta foram encontradas concentrações significativamente menores de arginina ( $P < 0,05$ ), quando comparados com o tratamento de 35% PB. Os tratamentos com 45 e 50% de PB apresentaram concentrações estatisticamente menores de leucina e valina, quando comparado com outros tratamentos. As concentrações de lisina foram significativamente menores no nível de 50% quando comparado com 40%. Os aminoácidos livres não essenciais mais abundantes na carcaça das pós-larvas foram glicina, alanina, prolina e taurina (Tabela 6). Os aminoácidos essenciais totais mais abundantes no corpo das pós-larvas foram a lisina, leucina, valina e treonina (Tabela 6). Os tratamentos com 35 e 45% de PB apresentaram concentrações menores ( $P < 0,05$ ) de leucina e lisina, quando comparado com outros tratamentos. As concentrações de valina foram maiores ( $P < 0,05$ ) no nível de 40% quando comparado com níveis de 35, 45 e 50% de PB. Nos tratamentos com 40 e 50% de proteína bruta foram encontradas concentrações maiores de leucina ( $P < 0,05$ ), quando comparados com os tratamentos de 35 e 45% de PB. As concentrações de treonina foram maiores ( $P < 0,05$ ) no nível de 50% de PB, quando comparado com o nível de 35% de PB. Os aminoácidos essenciais totais: arginina, histidina, leucina, lisina, metionina e treonina das larvas zoea VII foram significativamente iguais aos encontrados no tratamento suplementado com 50% de PB (Tabela 6).

$^{13}\text{U} = \mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$

Tabela 6. Composição de aminoácidos livres, ligados a proteínas e totais (g/100g de proteína) encontrados na carcaça de pós-larvas e de larvas na fase zoea VII.

Aminoácidos	Livres					Ligados a proteínas					Totais					
	% de proteína da dieta					% de proteína da dieta					% de proteína da dieta					
	35	40	45	50	Zoea VII	35	40	45	50	Zoea VII	35	40	45	50	Zoea VII	
<sup>b</sup> AANE																
Arginina	0,18 <sup>a</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,06 <sup>c</sup>	0,08	2,31	2,02	2,17	2,16	2,05	2,49 <sup>a</sup>	2,14 <sup>b</sup>	2,30 <sup>ab</sup>	2,22 <sup>b</sup>	2,13 <sup>b</sup>	
Histidina	0,07 <sup>a</sup>	0,00 <sup>c</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,04	1,24	1,37	1,07	1,19	1,34	1,31 <sup>ab</sup>	1,37 <sup>ab</sup>	1,12 <sup>b</sup>	1,21 <sup>ab</sup>	1,38 <sup>ab</sup>	
Isoleucina	0,06 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,08	2,31	2,50	2,45	2,35	2,57	2,37 <sup>d</sup>	2,58 <sup>b</sup>	2,49 <sup>c</sup>	2,38 <sup>d</sup>	2,64 <sup>a</sup>	
<b>Leucina</b>	0,11 <sup>b</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,08 <sup>c</sup>	0,06 <sup>c</sup>	0,14	4,21	4,65	4,21	4,52	4,59	<b>4,33<sup>b</sup></b>	<b>4,81<sup>a</sup></b>	<b>4,29<sup>b</sup></b>	<b>4,58<sup>a</sup></b>	<b>4,72<sup>a</sup></b>	
<b>Lisina</b>	0,17 <sup>b</sup>	0,21 <sup>a</sup>	0,16 <sup>b</sup>	0,08 <sup>c</sup>	0,18	6,95	7,45	6,95	7,58	7,64	<b>7,12<sup>b</sup></b>	<b>7,66<sup>a</sup></b>	<b>7,11<sup>b</sup></b>	<b>7,66<sup>a</sup></b>	7,82 <sup>a</sup>	
Metionina	0,03 <sup>ab</sup>	0,04 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,01 <sup>bc</sup>	0,04	1,69	2,06	1,87	1,71	1,87	1,72 <sup>b</sup>	2,09 <sup>a</sup>	1,90 <sup>ab</sup>	1,73 <sup>b</sup>	1,91 <sup>ab</sup>	
Fenilalanina	0,06 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,05 <sup>ab</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,07	2,20	2,37	2,33	2,05	2,37	2,25 <sup>b</sup>	2,44 <sup>a</sup>	2,37 <sup>a</sup>	2,08 <sup>c</sup>	2,44 <sup>a</sup>	
<b>Treonina</b>	0,07 <sup>ab</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,03 <sup>c</sup>	0,07	2,36	2,57	2,52	2,52	2,60	<b>2,44<sup>b</sup></b>	<b>2,66<sup>ab</sup></b>	<b>2,58<sup>ab</sup></b>	<b>2,56<sup>a</sup></b>	2,67 <sup>a</sup>	
<b>Valina</b>	0,09 <sup>b</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,07 <sup>c</sup>	0,04 <sup>d</sup>	0,10	3,19	3,52	3,35	3,26	3,71	<b>3,28<sup>d</sup></b>	<b>3,63<sup>b</sup></b>	<b>3,42<sup>c</sup></b>	<b>3,30<sup>d</sup></b>	3,81 <sup>a</sup>	
<b>Σ</b>	<b>0,85<sup>a</sup></b>	<b>0,88<sup>a</sup></b>	<b>0,67<sup>b</sup></b>	<b>0,37<sup>c</sup></b>	<b>0,80</b>	<b>26,46</b>	<b>28,51</b>	<b>26,91</b>	<b>27,34</b>	<b>28,73</b>	<b>27,31<sup>b</sup></b>	<b>29,39<sup>a</sup></b>	<b>27,58<sup>b</sup></b>	<b>27,71<sup>b</sup></b>	<b>29,53<sup>a</sup></b>	
<sup>c</sup> AANE																
Ácido aspártico	0,02 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,02 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,03	4,89	4,99	5,02	4,53	5,39	4,91 <sup>bc</sup>	5,01 <sup>ab</sup>	5,04 <sup>ab</sup>	4,54 <sup>c</sup>	5,42 <sup>a</sup>	
Serina	0,07 <sup>a</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,04 <sup>bc</sup>	0,03 <sup>c</sup>	0,05	2,48	2,51	2,61	2,68	2,64	2,55 <sup>b</sup>	2,56 <sup>b</sup>	2,65 <sup>ab</sup>	2,71 <sup>a</sup>	2,69 <sup>a</sup>	
Ácido glutâmico	0,08 <sup>b</sup>	0,12 <sup>a</sup>	0,11 <sup>a</sup>	0,05 <sup>c</sup>	0,12	6,70	7,08	6,86	7,50	7,70	6,78 <sup>d</sup>	7,20 <sup>c</sup>	6,97 <sup>d</sup>	7,54 <sup>b</sup>	7,83 <sup>a</sup>	
Prolina	0,19 <sup>a</sup>	0,18 <sup>ab</sup>	0,17 <sup>b</sup>	0,08 <sup>c</sup>	0,04	2,23	2,28	2,21	2,17	1,82	2,42 <sup>a</sup>	2,46 <sup>a</sup>	2,38 <sup>a</sup>	2,25 <sup>a</sup>	1,86 <sup>b</sup>	
Glicina	1,12 <sup>a</sup>	0,89 <sup>b</sup>	1,12 <sup>a</sup>	0,46 <sup>c</sup>	0,37	9,86	9,39	10,83	10,04	8,77	10,98 <sup>a</sup>	10,28 <sup>c</sup>	11,95 <sup>a</sup>	10,50 <sup>c</sup>	9,14 <sup>d</sup>	
Alanina	0,53 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	0,46 <sup>b</sup>	0,22 <sup>c</sup>	0,30	6,87	7,05	6,86	7,28	7,48	7,40 <sup>b</sup>	7,59 <sup>ab</sup>	7,32 <sup>b</sup>	7,50 <sup>ab</sup>	7,78 <sup>a</sup>	
Cistina	0,01 <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,02	0,39	0,51	0,39	0,31	0,39	0,40 <sup>b</sup>	0,51 <sup>a</sup>	0,39 <sup>b</sup>	0,31 <sup>b</sup>	0,41 <sup>b</sup>	
Tirosina	0,05 <sup>a</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,06	1,49	1,72	1,66	1,38	1,58	1,54 <sup>cd</sup>	1,78 <sup>a</sup>	1,71 <sup>b</sup>	1,40 <sup>d</sup>	1,65 <sup>bc</sup>	
Taurina	0,24 <sup>a</sup>	0,19 <sup>b</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,11 <sup>c</sup>	0,07	1,58	1,43	1,76	1,73	1,15	1,82 <sup>b</sup>	1,62 <sup>c</sup>	2,01 <sup>a</sup>	1,83 <sup>b</sup>	1,22 <sup>d</sup>	
<b>Σ</b>	<b>2,31<sup>a</sup></b>	<b>2,06<sup>b</sup></b>	<b>2,22<sup>ab</sup></b>	<b>0,98<sup>c</sup></b>	<b>1,06</b>	<b>36,48</b>	<b>36,96</b>	<b>38,21</b>	<b>37,62</b>	<b>36,91</b>	<b>38,79<sup>c</sup></b>	<b>39,01<sup>b</sup></b>	<b>40,43<sup>a</sup></b>	<b>38,60<sup>c</sup></b>	<b>37,97<sup>d</sup></b>	
Proteína total (%)	<b>3,16<sup>a</sup></b>	<b>2,93<sup>b</sup></b>	<b>2,89<sup>b</sup></b>	<b>1,35<sup>c</sup></b>	1,86	62,94	65,47	65,12	64,96	65,64	<b>66,10<sup>c</sup></b>	<b>68,40<sup>a</sup></b>	<b>68,01<sup>a</sup></b>	<b>66,31<sup>c</sup></b>	<b>67,50<sup>b</sup></b>	
Relação: AAE/AANE	0,37:1	0,43:1	0,30:1	0,38:1	0,76:1	0,73:1	0,77:1	0,70:1	0,73:1	0,78:1	0,70:1	0,75:1	0,68:1	0,72:1	0,78:1	

<sup>a</sup>Grupo INVE, Bélgica. nd: não detectado. <sup>b</sup>AAE: aminoácidos essenciais. <sup>c</sup>AANE: aminoácidos não essenciais. Os aminoácidos totais essenciais mais abundantes nas carcaças estão indicados em negrito. Médias seguidas na mesma linha por diferentes letras são estatisticamente diferentes (P<0,05).

#### 4. DISCUSSÃO

A produtividade (PL L<sup>-1</sup>) foi maior nas larvas de *M. rosenbergii* que foram alimentadas com dietas contendo um nível de inclusão de 50% de proteína. Dietas contendo níveis de 35 e 40% de proteína resultaram em as maiores porcentagens de larvas ao final da larvicultura, mostrando que estes níveis retardaram as mudas e, portanto a metamorfose final em pós-larva. Os menores índices de estágio larval e condição larval foram obtidos na dieta suplementada com 35% de proteína, que, portanto, não deve ser usada em produções comerciais porque prolongaria o tempo de larvicultura. A biomassa de PL não variou para os níveis de 35, 45 e 50%, mas estes valores foram diferentes para a dieta suplementada com 40% de proteína. Roustaian e Kamarudin (2001) avaliaram as mudanças na composição protéica corporal durante o desenvolvimento larval de *M. rosenbergii*, e encontraram aumento de 37% entre as fases de zoea I e zoea VIII/IX. Níveis dietéticos ótimos de proteína para larvas de crustáceos variam entre 23 e 57% (Takeuchi e Murakami, 2007). Holme et al., 2009 relatam variações entre 30 e 79,4% (Tabela 7). Em larvas de camarões marinhos como o *Penaeus monodon* a exigência de proteína bruta (PB) varia entre 30 e 56% (Khannapa, 1979; Kurmaly et al., 1989), e no *Penaeus japonicus* entre 44 e 55% de PB (Besbes, 1987; Kanazawa, 1990). Kamarudin e Roustaian (2002), trabalhando com larvas de *M. rosenbergii*, relataram bons desempenhos produtivos, utilizando um nível de inclusão de proteína na dieta de ~ 57%. Neste estudo, as larvas alimentadas com diferentes níveis de proteína não apresentaram diferenças nas taxas de sobrevivência, mas um nível de 35% de PB mostrou decréscimo na produtividade, havendo maior porcentagem de larvas que não conseguiram atingir a metamorfose. Portanto, níveis de proteína acima de 45% devem acelerar o desenvolvimento larval.

Segundo Cuzon e Guillaume (1997), o nível de energia digestível das rações para juvenis e adultos de crustáceos varia entre 3.100 e 4.060 kcal/kg. O excesso de energia limita os resultados zootécnicos, uma vez que o animal pode saciar-se energeticamente sem que sejam atendidas suas exigências para os demais nutrientes, fundamentais ao seu desenvolvimento e saúde (Pezzato, 2002). Pesquisas sobre a relação energia:proteína com peneídeos foram desenvolvidas por Shiau e Chou (1991) e Shiau e Peng (1992). Cousin et al. (1993) propõem que a relação E:P seja de 11,9:1,0 para diferentes espécies de peneídeos (*P. vannamei*, *P. monodon* e *P. setteferos*), e que

se essa relação fosse maior, poderia dar prejuízos ao desempenho produtivo dessas espécies.

Tabela 7. Níveis protéicos dietéticos tipicamente usados em dietas formuladas para larvas de crustáceos.

Espécies	Proteína Dietética	Referencia
<i>Penaeus monodon</i>	30%	Khannapa (1979)
<i>P. monodon</i>	44%	Kurmaly et al. (1989 <sup>a</sup> )
<i>P. monodon</i>	48-52%	Kurmaly et al. (1989 <sup>b</sup> )
<i>P. monodon</i>	55%	Paibulkichakul et al. (1998)
<i>P. japonicus</i>	50%	Kanazawa et al. (1985)
<i>P. japonicus</i>	44%	Besbes (1987)
<i>P. japonicus</i>	45-55%	Kanazawa et al. (1990)
<i>P. japonicus</i>	56%	Moe et al. (2004)
<i>P. indicus</i>	40-40,8%	Immanuel et al. (2003)
<i>P. vannamei</i>	52,7%	Pedroza-Islas et al. (2004)
<i>P. setiferus</i>	52,7%	Gallardo et al. (2002)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	46,1%	Kovalenko et al. (2002)
<i>M. rosenbergii</i>	56,9-57,6%	Kamarudin e Roustaian (2002)
<i>Homarus americanus</i>	57%	Fiore e Tlusty (2005)
<i>Sylla serrata</i> (megalopa)	79,4%	Genodepa et al. (2004)
<i>S. serrata</i> (megalopa)	55%	Holme et al. (2006)

Adaptado de Holme et al. (2009)

Pezzato et al. (2003) determinaram altas taxas de sobrevivência em pós-larvas de *Macrobrachium amazonicum*, que foram alimentadas com dietas que continham 30% de proteína e 3.600 kcal de energia bruta (correspondendo à relação E:P de 12,0:1,0). Estes resultados discordam de Bautista (1986) e de Sumerlin (1988), que realizaram estudos com juvenis de *M. rosenbergii* e propuseram, respectivamente, a relação E:P entre 5,7 e 8,3 e de 6,3 e 7,7. Neste estudo, larvas de *M. rosenbergii* alimentadas com dietas que continham 50% de proteína e 4.700 kcal de energia bruta (correspondendo à relação E:P de 9,5:1,0), mostraram as maiores produtividades.

O baixo desempenho produtivo das larvas que foram alimentadas com dieta inerte suplementada com 35% de proteína, provavelmente possa ser explicado pelas menores quantidades de aminoácidos essenciais totais encontrados nesta dieta, especialmente de leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina e valina. No entanto, em termos de aminoácidos essenciais livres, ocorreu o contrário, pois nas dietas com 35 e 40% de PB foram determinadas as maiores concentrações destes aminoácidos quando comparadas com os outros níveis. As análises de composição de aminoácidos essenciais totais dos náuplios de *Artemia* mostraram que estes são uma boa fonte de isoleucina, lisina, treonina e valina, contrario ao encontrado nas dietas teste, nas quais estes

aminoácidos essenciais totais foram menos abundantes. Assim, por exemplo, as dietas testes mostraram ser boas fontes de aminoácidos essenciais totais, como a arginina e a metionina, os quais se encontraram em menores porcentagens nos náuplios de *Artemia*. Por outro lado, as análises de composição de aminoácidos não essenciais totais dos náuplios de *Artemia* mostraram que eles são uma boa fonte de serina, prolina, alanina e tirosina, oposto ao encontrado nas dietas teste, nas quais estes aminoácidos não essenciais totais foram menos abundantes. A dieta inerte com nível de inclusão de 50% de proteína mostrou o melhor desempenho produtivo e apresentou níveis mais elevados de aminoácidos não essenciais totais tais como o aspártico e o glutâmico, os quais se encontraram em menores porcentagens nos náuplios de *Artemia*. Essas diferenças descritas acima poderiam explicar o sucesso da co-alimentação, que consiste no fornecimento conjunto da dieta inerte e os náuplios de *Artemia*, utilizada nas larviculturas de todo o mundo, já que estes alimentos apresentam aporte diferenciado de nutrientes em termos de perfil protéico.

Na composição da carcaça das PLs de *M. rosenbergii* os aminoácidos essenciais e não essenciais totais não apresentaram aumento proporcional ao incremento do nível de proteína nas dietas. Os resultados do melhor tratamento (50% de proteína na dieta) no que diz respeito à composição corporal de aminoácidos essenciais totais das PLs de *M. rosenbergii*, indicam que a relação ideal aminoácidos essenciais (AE) e aminoácidos não essenciais (ANE) pode ser 0,81:1. Além disso, os aminoácidos essenciais totais desta dieta em ordem decrescente de importância são Lys>Leu>Val>Thr>Met>Phe=Ile>Arg>His.

Analisando detalhadamente a composição em aminoácidos essenciais totais dos náuplios de *Artemia*, da dieta inerte suplementada com 50% de lipídeos e da carcaça das pós-larvas alimentadas com a combinação de alimento vivo e inerte, podem-se estabelecer algumas relações interessantes. O aminoácido essencial mais abundante na carcaça das PLs foi a lisina (11,2%), similarmente aos náuplios de *Artemia* e à dieta inerte (12,6 e 9,9%, respectivamente). Os aminoácidos essenciais arginina e metionina ocorrem em valores inferiores nos náuplios de *Artemia* (1,9 e 2,4%, respectivamente) quando comparados com a carcaça das PLs e com a dieta inerte de 50% de PB (3,1 e 3,1% e 3,4 e 4,2%, respectivamente) mostrando que a dieta inerte é uma boa fonte destes aminoácidos. Por outro lado, o aminoácido não essencial mais abundante na carcaça das PLs foi a glicina (15,0%), que ocorreu em proporção menor nos náuplios de

*Artemia* e na dieta inerte (10,7 e 9,4%, respectivamente), indicando que ambos não são uma boa fonte deste aminoácido.

A associação entre os níveis de atividade enzimática e os níveis de proteínas e carboidratos na dieta não mostraram nenhuma relação clara. Assim, não podemos afirmar que a quantidade de substrato induza a produção de enzimas específicas para a sua digestão. As respostas na produção das enzimas poderiam ser mascaradas pela ingestão conjunta dos náuplios de *Artemia*. Outros estudos precisam ser realizados para elucidar esse assunto.

Analisando os valores encontrados de proteína e porcentagem de aminoácidos (AA) na composição corporal das pós-larvas de *M. rosenbergii*, fica evidente que as dietas inertes normalmente usadas na larvicultura de *M. rosenbergii*, (que foram usadas como referência para a definição das dietas testadas nesse trabalho), não atendem as exigências protéicas ou ao perfil de AA para esta espécie. Embora os resultados indiquem que o nível de 50% de proteína na dieta e uma relação energia:proteína de 9,5:1 durante a larvicultura de *M. rosenbergii* foi mais adequado para aumentar a produtividade, valores mais altos (que não foram testados) poderiam ser melhores. Por outro lado, valores menores poderiam ser suficientes se o perfil de aminoácidos for mais adequado. Novos estudos precisam ser realizados para testar essas hipóteses.

## 5. AGRADECIMENTOS

Às relações bilaterais entre o governo da Republica Federativa do Brasil e da Republica da Colômbia, sob amparo do Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG-CAPES) pela bolsa de doutorado concedida para o primeiro autor, 7processo n° 0078042. Ao Professor Dalton José Carneiro pela ajuda na formulação das dietas experimentais. Nós também gostaríamos de agradecer à Profa. Dra. Alessandra da Silva Augusto do Laboratório de Química de Proteínas da Universidade de São Paulo (USP) Ribeirão Preto – SP, Brasil pela elaboração das análises aminoácidos livres e totais.

## REFERÊNCIAS

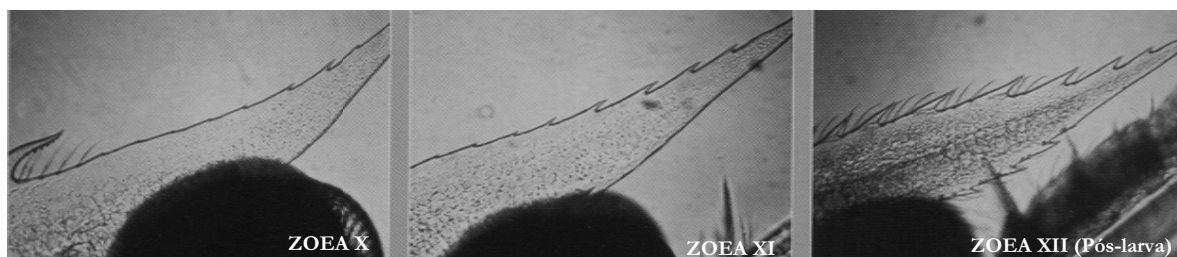
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION -APHA. 2005. Standard methods for the examination of water & wastewater. AWWA e WEF. 21 ed. Part. 2320, 2-27 p. Part. 4500-P, 4-416 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1998. Official Methods of Analysis of the AOAC International, 16th edition. AOAC International, Gaithersburg, M.D., USA.
- BAUTISTA, L. 1986. The response of *Macrobrachium rosenbergii* juveniles to varying protein/energy ratio in tests diets. *Aquaculture*, v. 53, 229-234 p.
- BESBES, R. 1987. Elaboration de microparticules alimentaires destinées a remplacer la nourriture vivante dans l'élevage des larves de la crevette *P. japonicus* (Crustacea Decapoda). Mémoire diplôme Institut National Recherche Agronomique, Rennes, France.
- BERNFELD, P. 1955. Amylases  $\alpha$  e  $\beta$ : colorimetric assay method. In: COLOWICH, S.P. & KAPLAN, N.O. *Methods in Enzimology*. (eds). Vol. 1. New York: Academic Press Inc. pp. 149-154.
- BIDLINGMEYER, B.A.; COHEN, S.A.; TARVIN, T.L.; FROST, B. 1987. A new, rapid, high-sensitivity analysis of amino acids in food type of samples. *Journal Association Off. Anal. Chem.* No. 70. 241-247 p.
- CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161-180 p.
- COUSIN, M. et al. 1993. Protein requirements following and optimum dietary energy to protein ratio for *P. vannamei* juveniles. In: KAUSHIK, S.J.; LUQUET, P. (Ed.). *Fish nutrition in practice*. Paris: INRA, 599-606 p.
- CUZON, G.; GUILLAUME, J. 1997. Energy and protein:energy ratio. In: D'ABRAMO, L.R. et al. *Crustacean Nutrition (EU)*. Baton Rouge, Louisiana: WAS, 1997. Cap. 1, 51-70 p.
- DANIELS, W.H.; D'ABRAMO, L.R.; DE PARSEVAL, L. 1992. Design and management of a closed, recalculating, "clear-water" hatchery system for freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal Shellfish Research*. 11. 65-73.
- GUERRERO-ALVARADO, C.E; VALENTI, W.C. 2009. Níveis de cálcio, fósforo, lipídeo e proteína na dieta inerte do camarão-da-malásia *Macrobrachium rosenbergii*, na fase larval. Capítulo II e III. Tese de Doutorado, Unesp-Jaboticabal,SP. 108 p.
- HOLME, M.H.; ZENG, C.; SOUTHGATE, P.C. 2009. A review of recent progress toward development of a formulated microbound diet for mud crab, *Scylla serrata*, larvae and their nutritional requirements. *Aquaculture* 286, 164-175 p.
- HUNG, L.T., TUAN, N.A., CACOT, P., LAZARD, J. 2002. Larval rearing of Asian catfish, *Pangasius bocourti* (Siluroidei, Pangasiidae): alternative feeds and weaning time. *Aquaculture* 212, 115 – 127 p.
- HUMMEL, B.C.W. 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37 (12): 1393-1399.

- KAMARUDIN, M.S.; ROUSTAIA, P. 2002. Growth and fatty acid composition of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, larvae fed diets containing various ratios of cod liver oil-corn oil mixture. Journal Applied Ichthyology. 18. 148-153p.
- KANAZAWA, A. 1990. Microparticulate feeds for penaeid larvae. Advances in tropical aquaculture. Actes de Colloque 9. AQUACOP.INFREMER.Tahiti. pp. 395-404.
- KHANNAPA, A. 1979. Effect of various protein levels on growth and survival rates for *Penaeus monodon*. Quarterly research report, Aquaculture Department, South East Asian Fisheries Development Centre. I.:24-48.
- KURMALY, K.; YULE, A.B.; JONES, D.A. 1989. An energy budget for the larvae of *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquaculture 81. 13-25 p.
- LAVENS, P., THONGROD, S., SORGELOOS, P. 2000. Larval prawn feeds and the dietary importance of *Artemia*. In: New, M.B., Valenti, W.C. (Eds.), Freshwater Prawn Culture: The farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Blackwell Science Ltd. Oxford-United Kingdom. 91-111 p.
- MANZI, J.J., MADDOX, M.B., SANDIFER, P.A., 1977. Algal supplement enhancement of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) larviculture. Journal World Mariculture Society, 8, 207-223 p.
- PEZZATO, L.E. 2002. Qualidade dos ingredientes, processamento e eficiência alimentar em aqüicultura. In: Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, 12, 2002, Goiânia: ABRAq, 2002. 11-118 p.
- PEZZATO, L.E. ; BARROS, M.M.; SAMPAIO, F.G.; FALCON, D.R.; GONCALVES, G.S.; HISANO, H. 2003. Relação energia:proteína para pós-larvas de *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda). Acta Scientiarum. Animal Sciences. Vol. 25, no. 2, 235-241 p.
- PITIPORNCHAI, S. 1998. Experiment on rearing giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), larvae different feeds. Technical Paper No. 11/1998. Inland Fisheries Division. Departamento of Fisheries, Bangkok.
- SHIAU, S. Y.; CHOU, B.S. 1991. Effects of dietary protein and energy on growth performances of tiger shrimp *Penaeus monodon* reared in sea water. Nippon Suisan Gakkaishi, Tokyo. v. 57, n.12, 2271-2276 p.
- SHIAU, S. Y.; PENG, C.Y. 1992. Utilization of different carbohydrates at different dietary protein levels in grass prawn *Penaeus monodon* reared in sea water. Aquaculture, v. 101, 240-250 p.
- SORGELOOS, P.; LEGER, P. 1992. Improved larviculture outputs of marine fish, shrimp and prawn. Journal of the World Aquaculture Society. 23. 251-264 p.
- SUMERLIN, G.C. 1988. Nutrition of juvenile *Macrobrachium rosenbergii*: the effect of available surface area, dietary protein level and dietary protein to energy rates. Thesis (Master) – Mississippi State University.
- TAKEUCHI, T.; MURAKAMI, K. 2007. Crustacean nutrition and larval feed, with emphasis on Japanese spiny lobster, *Panilurus japonicus*. Bull. Fish. Res. Agen. No. 20. 15-23 p.
- TAYAMEN, M.; BROWN, J.H. 1998. A condition index for evaluating larval quality of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). Aquaculture Research, 30:917-922.

- ROUSTAIAN, P., KAMARUDIN, M.S. 2001. Biochemical changes in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* during the larval development. Journal of World Aquaculture Society, v. 32, no.1, 53-59 p.
- UNO, Y., KWON, C.S. 1969. Larval development of *Macrobrachium rosenbergii* reared in the laboratory. Journal of the Tokyo University Fisheries. 55. 179-191 p.
- VALENTI, W.C.; DANIELS, W.H. 2000. Recirculation Hatchery Systems and Management. In: NEW, M.B.; VALENTI, W.C. (Eds.) Freshwater prawn culture: The farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Oxford, Blackwell Science. p. 69-90.
- VALENTI, W.C.; MALLASEN, M.; SILVA, C.A. 1998. Larvicultura em sistema fechado dinâmico. In: VALENTI, W.C. (Ed.) Carcinicultura de Água Doce: Tecnologia para a Produção de Camarões. Brasília., FAPESP/IBAMA. p. 112- 139.
- WALTER, H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In. BERGMAYER, H.U. (Ed). Methods of Enzymatic Analysis, vol. V. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 270-277.

# CAPÍTULO 5

## CONSIDERAÇÕES FINAIS



FONTE DAS FOTOS: TAKUJI FUJIMURA

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estratégia alimentar mundialmente usada na larvicultura de *M. rosenbergii* é baseada na combinação de náuplios de *Artemia* recém-eclodidos e dieta inerte úmida composta pela mistura de ovos de galinha, peixe, molusco, leite de vaca em pó, farinha de trigo e óleo de peixe, o que gera um creme ou pudim. Embora tanto os náuplios de *Artemia* como a dieta inerte apresentem variações nutricionais importantes, conforme o local de cultivo, essa combinação tem dado bons resultados, viabilizando a produção de PL em diferentes regiões do planeta. Isso indica que deve haver um padrão básico nos componentes nutritivos dessa dieta que se repetem e, grosso modo, suprem as necessidades básicas das larvas de *M. rosenbergii*. As variações em produtividade média observadas entre diferentes larviculturas podem ser, em parte, devidas a variações na composição do alimento. Assim sendo, o lote de náuplios de *Artemia* que trabalhamos e a dieta inerte (creme de ovos) usada no CAUNESP podem ser considerados como uma amostra dos alimentos usados mundialmente.

O sucesso obtido com a combinação dos náuplios de *Artemia* e o creme de ovos devem-se, provavelmente ao caráter complementar desses alimentos (Anexo 1 e 2). Os náuplios de *Artemia* são deficientes em cálcio (Tabela 2, Capítulo 2) e no ácido docosahexaenóico (DHA) que são supridos pela dieta inerte. Por outro lado, esta é pobre em fósforo e deficiente nos ácidos graxos: esteárico (18:0),  $\alpha$ -linolênico (18:3n-3) e araquidônico (20:4n-6). Também apresenta baixo teor protéico (<50%) e deficiência dos aminoácidos essenciais totais: histidina, lisina, treonina e valina, que são supridos pelos náuplios de *Artemia*. Isso explica as baixas sobrevivências e produtividades observadas em cultivos realizados somente com náuplios de *Artemia* ou com dieta inerte. Considerando a composição da carcaça das PL, as duas fontes de alimento são deficientes no ácido graxo eicosapentaenóico (20:5 n-3), nos aminoácidos essenciais: arginina, metionina e fenilalanina, nutrientes que precisariam ser adicionados na dieta inerte.

Os resultados desse trabalho mostraram que dietas suplementadas com 1% de fósforo e mistura de ingredientes de tal modo a obter-se um teor de lipídeos e proteínas de aproximadamente 16 e 50%, respectivamente, melhoram sensivelmente a produtividade (PL L<sup>-1</sup>), aproximando-se ao perfil de ácidos graxos e aminoácidos essenciais encontrados na carcaça das pós-larvas (Anexo 3). Aparentemente, a mistura

dos óleos de peixe e milho não seja adequada para suprir as exigências dos ácidos graxos: araquidônico, EPA e DHA. Talvez, o uso de apenas óleo de peixe melhore as quantidades destes ácidos. Fontes de óleos ricos em Omega 3 tais como o óleo de linhaça e o óleo de canola poderiam ser testados nas dietas. Outras fontes desses ácidos também deveriam ser incluídas nas dietas (filé de peixes marinhos como a sardinha, o arenque, o salmão e o atum) e algumas microalgas marinhas de águas frias, produtoras primárias de EPA e DHA com teores de 5 a 10% da matéria seca, que permitiriam que a dieta inerte se tornasse mais próxima à composição da carcaça das PL. Possivelmente, a produtividade aumente com a complementação da dieta com esses nutrientes. Futuros estudos devem ser desenvolvidos, para afinar os resultados desta pesquisa, pois precisam ainda ser definidas outras exigências, por exemplo, de fosfolipídios, entre eles principalmente a fosfatidilcolina (PC), o fosfatidilinositol (PI), o colesterol e o  $\beta$ -caroteno (precursor da vitamina A), os quais têm mostrado sua importância na área de nutrição de crustáceos. Como a quantidade usada é pequena, não se descarta também a possibilidade de suplementação com aminoácidos sintéticos. Análises econômicas devem ser realizadas para avaliar se o aumento em produtividade compensa o aumento no custo da alimentação com a adição desses ingredientes.

As larvas de *M. rosenbergii* ingerem muito bem a dieta inerte a partir do estágio VII (Barros e Valenti, 2003). Portanto, a formulação de uma dieta balanceada, que atenda suas exigências nutricionais poderia dispensar ou reduzir o uso dos náuplios de *Artemia* a partir dessa fase, que corresponde a mais da metade do período de cultivo. Os resultados desta pesquisa mostraram a necessidade e a importância da continuidade de estudos que investiguem o adequado balanceamento de ácidos graxos e aminoácidos. Estes iriam contribuir ao entendimento dos processos bioquímicos do metabolismo nutricional das larvas de *M. rosenbergii*, fornecendo informações para a formulação de uma dieta inerte melhor balanceada de modo a aumentar a produtividade e substituir parcialmente o uso de alimento vivo, reduzindo os custos de produção.

Anexo 1. Composição de ácidos graxos (g/100 g) da dieta experimental com 16% de lipídeo, dos náuplios de *Artemia*, da carcaça das larvas zoea VII, das pós-larvas (PL) alimentadas com 16% de lipídeo e da dieta normalmente usada nas larviculturas (pudim tradicional).

Ácido graxo	Dieta 16% de lipídeo	Náuplios de <i>Artemia</i>	Carcaça larvas Zoea VII	Carcaça PL (dieta 16% de lipídeo)	Dieta Tradicional (25% de Lipídeo)
8:0 (Caprílico)	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03
10:0 (Capríco)	0,02	0,00	0,00	0,00	0,06
12:0 (Láurico)	0,03	0,00	0,00	0,00	0,09
14:0 (Mirístico)	0,18	0,09	0,06	0,10	0,47
14:1 (Miristoleico)	0,01	0,00	0,00	0,00	0,05
15:0 (Pentadecanoico)	0,02	0,02	0,01	0,02	0,06
16:0 (Palmitico)	2,39	1,83	0,81	1,57	6,23
16:1 <i>n</i> -7 (Palmitoléico)	0,11	0,26	0,04	0,04	0,62
17:0 (Heptadecanoico)	0,02	0,07	0,05	0,07	0,08
18:0 (Estearico)	0,57	0,78	0,47	0,80	2,39
18:1 <i>n</i> -9 (Oléico)	4,80	3,98	1,09	1,73	10,03
18:2 <i>n</i> -6 (Linoléico)	5,56	1,10	0,18	0,62	2,34
18:3 <i>n</i> -6 (Linoléico)	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00
18:3 <i>n</i> -3 (Linoléico)	0,18	5,78	0,42	0,62	0,07
20:1 <i>n</i> -9 (Eicosenoico)	0,06	0,11	0,01	0,00	0,08
20:2 (Eicosadienoico)	0,00	0,04	0,02	0,03	0,00
20:3 <i>n</i> -3 (Eicosatrienoico)	0,00	0,04	0,10	0,11	0,00
20:4 <i>n</i> -6 (Araquidônico)	0,00	0,21	0,05	0,07	0,00
20:5 <i>n</i> -3 (EPA) <sup>a</sup>	0,13	0,25	0,57	0,61	0,06
22:6 <i>n</i> -3 (DHA) <sup>b</sup>	0,31	0,00	0,07	0,23	0,24
não identificado (nd)	0,00	0,75	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>	<b>14,40</b>	<b>15,41</b>	<b>3,96</b>	<b>6,62</b>	<b>22,92</b>
Saturados	3,24	2,78	1,41	2,56	9,42
Insaturados	11,17	12,63	2,55	4,07	13,50
Monoinsaturados	4,98	5,09	1,14	1,78	10,78
Polinsaturados	6,19	7,53	1,41	2,29	2,72
PUFA <sup>c</sup>	5,56	1,43	0,24	0,69	2,34
HUFA <sup>d</sup>	0,23	5,81	0,56	0,87	0,09
HUFA/PUFA	0,04	4,06	2,35	1,26	0,04

<sup>a</sup>Ácido eicosapentaenoico. <sup>b</sup>Ácido docosahexaenoico. <sup>c</sup>Ácido graxo poliinsaturado. <sup>d</sup>Ácido graxo altamente poliinsaturado. nd: não detectado.

Anexo 2. Composição de aminoácidos totais (g/100 g) da dieta experimental com 50% de proteína, dos náuplios de *Artemia*, da carcaça das larvas Zoea VII e das pós-larvas (PL) alimentadas com 50% de proteína.

Aminoácidos totais (g/100g)	Pudim com 50% de proteína	Náuplios de <i>Artemia</i>	Carcaça Larvas Zoea VII	Carcaça PL alimentadas com 50% de proteína
Arginina	1,69	1,09	2,13	2,22
Histidina	1,09	1,20	1,38	1,21
Isoleucina	1,98	2,69	2,64	2,38
Leucina	3,37	3,90	4,72	4,58
Lisina	4,86	7,16	7,82	7,66
Metionina	2,08	1,38	1,91	1,73
Fenilalanina	1,98	1,95	2,44	2,08
Treonina	2,23	3,04	2,67	2,56
Valina	2,88	3,90	3,81	3,30
<b><math>\Sigma</math> AAE<sup>a</sup></b>	<b><u>22,17</u></b>	<b><u>26,30</u></b>	<b><u>29,53</u></b>	<b><u>27,71</u></b>
Acido aspártico	4,66	3,90	5,42	4,54
Serina	2,88	3,32	2,69	2,71
Acido glutâmico	7,79	6,70	7,83	7,54
Prolina	1,64	2,58	1,86	2,25
Glicina	5,31	5,44	9,14	10,50
Alanina	3,82	6,76	7,78	7,50
Cistina	0,20	0,29	0,41	0,31
Tirosina	0,79	1,32	1,63	1,40
Taurina	0,35	0,69	1,22	1,83
<b><math>\Sigma</math> AANE<sup>b</sup></b>	<b><u>27,43</u></b>	<b><u>31,00</u></b>	<b><u>37,97</u></b>	<b><u>38,60</u></b>
TOTAL	49,60	57,30	67,50	66,31
Relação AAE/AANE	0,81:1	0,85:1	0,78:1	0,72:1

<sup>a</sup>Aminoácidos essenciais. <sup>b</sup>Aminoácidos não essenciais.

Anexo 3. Recomendações de níveis de nutrientes para a dieta “ideal” de larvas do gênero *Macrobrachium*.

Nutriente	Gramas por 100 g de dieta seca	
	Mínimo	Maximo
Proteínas	<sup>14</sup> 50,0	<sup>18</sup> 57,60
Aminoácidos livres	0,13	
Aminoácidos ligados a proteínas	49,87	
Lipídios	<sup>15</sup> 12,32	<sup>19</sup> 16,00
Fosfolipídios (lecitina de soja)	<sup>16</sup> 1,0	
18:3 n-3 ( $\alpha$ -linoléico)	0,16	
20:5 n-3 (EPA)	0,13	
22:6 n-3 (DHA)	0,31	
DHA/EPA	2,30:1	
$\Sigma$ HUFAs n-3	0,23	
Carboidratos	23,0	28,6
Fibra	0,8	1,5
Vitaminas	1,0	
Minerais	10,9	13,4
Fósforo ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	<sup>17</sup> 1,50 (1,15 P disponível)	
Cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )		<sup>20</sup> 0,35
Ácido ascórbico	0,15	0,5

<sup>14</sup>Guerrero-Alvarado e Valenti (2009)

<sup>15</sup>Kamarudin e Roustaiian (2002)

<sup>16</sup>Kamarudin e Roustaiian (2002)

<sup>17</sup>Guerrero-Alvarado e Valenti (2009)

<sup>18</sup>Kamarudin e Roustaiian (2002)

<sup>19</sup>Guerrero-Alvarado e Valenti (2009)

<sup>20</sup>Guerrero-Alvarado e Valenti (2009)