

**MARINO EUGÊNIO DE ALMEIDA NETO**

**RELAÇÃO ENTRE PADRÃO COMPORTAMENTAL, ESTÁGIOS DO  
CICLO DE MUDA E ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS  
PROTEOLÍTICAS EM JUVENIS DO CAMARÃO MARINHO  
*Litopenaeus vannamei* (CRUSTACEA: PENAEIDAE).**

**Tese apresentada à Universidade Federal do  
Rio Grande do Norte, para obtenção do título  
de Doutor em Psicobiologia.**

**Natal – RN**

**2011**

**MARINO EUGÊNIO DE ALMEIDA NETO**

**RELAÇÃO ENTRE PADRÃO COMPORTAMENTAL, ESTÁGIOS DO  
CICLO DE MUDA E ATIVIDADE DE ENZIMAS DIGESTIVAS  
PROTEOLÍTICAS EM JUVENIS DO CAMARÃO MARINHO  
*Litopenaeus vannamei* (CRUSTACEA: PENAEIDAE).**

Tese apresentada à Universidade Federal do Rio  
Grande do Norte, para obtenção do título de  
Doutor em Psicobiologia.

Orientação: Profa. Dra. Maria de Fátima Arruda

**Natal – RN**

**2011**

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de Biociências

Almeida Neto, Marino Eugênio de.

Relação entre padrão comportamental, estágios do ciclo de muda e atividade de enzimas digestivas proteolíticas em juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae) / Marino Eugênio de Almeida Neto. – Natal, RN, 2011.

110 f. : Il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima de Arruda

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

1. Camarões – Tese 2. Etologia aplicada – Tese. 3. *Litopenaeus vannamei* – Tese. I. Arruda, Maria de Fátima de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 639.512

**Título: Relação entre padrão comportamental, estágios do ciclo de muda e atividade de enzimas digestivas proteolíticas em juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (CRUSTACEA: PENAEIDAE).**

**Autor: Marino Eugênio de Almeida Neto**

**Data/local da defesa: 28 DE FEVEREIRO DE 2011 - 09:00 horas**

**Anfiteatro das Aves, Centro de Biociências – UFRN**

**Banca Examinadora:**

---

Profa. Dra. Maria de Fátima Arruda  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

---

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Prof. Dr. Daniel Eduardo Lavanholi de Lemos  
Universidade de São Paulo – USP

---

Profa. Dra. Hélderes Peregrino da Silva  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

---

Prof. Dr. Marcos Rogério Câmara  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

**Considerando que o conhecimento liberta e a ignorância escraviza (desconhecido)...**

**...investir em conhecimento renderá o melhor juro (Benjamim Franklin),**

**A Liberdade.**

**Dedico esse trabalho a minha família,  
em especial a minha mãe, minha esposa e meus filhos.**

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo, gostaria de agradecer a Deus pelas bênçãos concedidas e a Santa Luzia, padroeira dos Mossoroenses, por me guiar nessa jornada.

A minha família, pelo incentivo dado a essa etapa de minha vida e por compreenderem minha ausência em diversas ocasiões. Especialmente minha mãe Maria Goretti, que sempre esteve presente nos momentos mais importantes de minha vida, não apenas nesses últimos 5 anos. A minha esposa Mércia, que além de cuidar de mim com amor, carinho e atenção extraordinários, me alegrou em momentos de grandes pressões com a simplicidade do convívio familiar. Aos meus filhos Marina, Mariane e Antônio, que representam a verdadeira força motriz de minhas realizações e são os protagonistas de meus pensamentos e anseios, quando alcanço uma nova conquista. Aos meus irmãos, que se disponibilizaram a me ajudar ou substituir em diversos momentos, assim como por compreenderem minha ausência em momentos importantes para eles.

A professora Maria de Fátima Arruda pela importantíssima orientação e por suas lições, que não se restringem ao projeto. Principalmente, por sua paciência e compreensão em alguns momentos dessa jornada. Também por acreditar em mim e na minha capacidade de superar obstáculos. Meu sincero obrigado!!

Ao professor Ranilson de Souza Bezerra por acreditar nesse projeto e abrir as portas de seu laboratório (LABENZ) para a realização das análises bioquímicas do segundo experimento. Por compartilhar um pouco de seus conhecimentos na área da bioquímica e pelo convite pra cursar disciplinas do programa de pós-graduação em bioquímica da UFPE, que me trouxe importantes conhecimentos nessa área. Também pela ajuda, companheirismo e momentos de descontração durante as vezes que estive em Recife. Muito obrigado!

Aos meus colegas de Laboratório de Estudos em Comportamento de Camarões Melquieges, Priscila, Bianca, Fernanda, Fábio e Felipe, por sua valiosa ajuda nos momentos de coleta de água, de areia, de camarões, limpeza e organização de laboratório e também na coleta de dados. Quanto esforço, hein... Ufa! Só de lembrar cansa. Sem vocês, o que foi difícil se aproximaria do impossível. Meu sincero obrigado!!

Aos meus colegas de Laboratório de Enzimologia (LABENZ) Augusto (Guto), Werlayne, Thalita, Ian, Diego, Thiago, Fábio, Renata, Marina, Helane, Karina, Dárlio e Juliana por sua preciosa ajuda e atenção no, absolutamente novo pra mim, mundo da bioquímica e das atividades enzimáticas, além dos excelentes momentos de descontração proporcionados pela família LABENZ. Um obrigado especial a Caio Dias por me acolher em sua casa em vários momentos e por ter se mostrado um bom amigo.

Aos colegas da pós-graduação em Psicobiologia que cursaram disciplina comigo pela troca de conhecimento e amizade, bem como pelos momentos no setor “T”.

Aos professores do programa que, de forma extremamente competente, me abriram as portas para um mundo novo. O comportamento animal, sob uma perspectiva evolutiva.

Aos professores Hélderes Peregrino e Arrilton Araújo pela valiosa participação na qualificação, fundamental na estruturação do atual trabalho.

A Universidade Federal do Rio Grande do Norte e ao programa de Pós-graduação em Psicobiologia por terem me aceito e proporcionado uma formação acadêmica de alto nível.

Ao Departamento de Agropecuária do Centro de Ciências Humanas Sociais e Agrárias – UFPB, ao Colégio Agrícola Vidal de Negreiros e a Coordenação do Curso Técnico em Aquicultura por compreenderem e permitirem minha ausência em alguns momentos. Em especial ao Prof. Marcelo Ribeiro e Prof. José Jordão.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão de bolsa de estudos, sem a qual seria impossível a realização desse projeto.

E, por fim, a fazenda de cultivo de camarões marinhos CAMANOR, em especial a Sra. Marisa Sonehara, por apoiar nosso projeto cedendo todos os sujeitos experimentais necessários.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>AGRADECIMENTOS.....</b>                                                                                                                                                                                                                                | vi  |
| <b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>                                                                                                                                                                                                                          | xi  |
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                                                                                                                                                                        | xiv |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                                                                                                                                                      | xv  |
| <b>1. APRESENTAÇÃO.....</b>                                                                                                                                                                                                                               | 1   |
| <b>2. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>                                                                                                                                                                                                                           | 3   |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                                                                                                                                  | 14  |
| 3.1 Objetivo Geral.....                                                                                                                                                                                                                                   | 14  |
| 3.2 Objetivos Específicos.....                                                                                                                                                                                                                            | 14  |
| 3.3 Hipóteses e Predições.....                                                                                                                                                                                                                            | 15  |
| <b>4. METODOLOGIA GERAL.....</b>                                                                                                                                                                                                                          | 17  |
| 4.1. Material Biológico.....                                                                                                                                                                                                                              | 17  |
| 4.2. Unidades Experimentais.....                                                                                                                                                                                                                          | 18  |
| <b>5. Experimento I – Relação entre o padrão comportamental dos camarões e estágios do ciclo de muda, nas fases de claro e de escuro.....</b>                                                                                                             | 20  |
| 5.1. Manuscrito 1 – Padrão comportamental em juvenis do camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i> (CRUSTACEA: PENAEIDAE), de acordo com os estágios do ciclo de muda e fases do fotoperíodo.....                                                        | 20  |
| <b>6. Experimento II – Avaliação da atividade de proteases digestivas do hepatopâncreas do camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i>, alimentados em diferentes horários, durante as fases de claro e de escuro.....</b>                                | 49  |
| <b>Experimento III – Avaliação da alimentação baseada em horários de máxima ou mínima atividade de proteases digestivas sobre o padrão comportamental do camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i>, nas fases de claro e de escuro.....</b>             | 49  |
| 6.1. Manuscrito 2 – Efeito dos diferentes horários de alimentação na atividade de protease digestiva não específica, específica (Tripsina) e padrão comportamental de juvenis do camarão marinho, <i>Litopenaeus vannamei</i> (CRUSTACEA: PENAEIDAE)..... | 47  |
| <b>8. DISCUSSÃO GERAL.....</b>                                                                                                                                                                                                                            | 73  |
| <b>9. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>                                                                                                                                                                                                                          | 80  |
| <b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                                                                                                                                | 81  |
| <b>11. ANEXOS</b>                                                                                                                                                                                                                                         | 87  |
| 11.1 Anexo 1                                                                                                                                                                                                                                              | 87  |

|              |    |
|--------------|----|
| 11.2 Anexo 2 | 89 |
| 11.3 Anexo 3 | 92 |
| 11.4 Anexo 4 | 93 |

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## Introdução

- Figura 1.** Diagrama geral da circulação do fluido da glândula digestiva no proventrículo dos decápodes. Linha pontilhada é o caminho do alimento sólido; linha contínua é o caminho do fluido. Onde AC, câmara anterior; AD, divertículo anterior do intestino médio; DG, abertura para a glândula digestiva; FP, prensa-filtro; LG, sulcos laterais; MG, glândula do intestino médio; O, ossículos do moinho gástrico; OES, esôfago; PC, câmara posterior; PCG, sulcos dorsolaterais da câmara posterior; VG, sulcos ventrais (Reproduzido de Dall e Moriarty, 1983)..... 6

## Metodologia Geral

- Figura 2.** Fotografia da espécie de estudo (*Litopenaeus vannamei*), associada a desenho esquemático de sua morfologia externa..... 17

- Figura 3.** Unidades experimentais usadas nos experimentos 1 e 3 (A) e no experimento 2 (B), destacando os biofiltros utilizados para a manutenção da qualidade da água. Em C temos a unidade experimental observada na fase de escuro e em D, destacamos a marcação com anéis de silicone (azul ou rosa) no pedúnculo ocular..... 18

## Manuscrito 1

- Figura 1.** Frequência média de ocorrência do comportamento parado de *L. vannamei*,  $\pm$  intervalo de confiança de 95%, de acordo com os estágios do ciclo muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Os estágios inscritos acima de cada barra representam aqueles em que houve diferença estatística..... 27

- Figura 2.** Frequência média de ocorrência dos comportamentos exploração e ingestão de alimento de *L. vannamei*,  $\pm$  intervalo de confiança de 95%, de acordo com os estágios do ciclo muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Os estágios inscritos acima de cada barra representam aqueles em que houve diferença estatística..... 29

- Figura 3.** Frequência média de ocorrência dos comportamentos natação e rastejamento de *L. vannamei*,  $\pm$  intervalo de confiança de 95%, de acordo com os estágios do ciclo muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Os estágios inscritos acima de cada barra representam aqueles em que houve diferença estatística..... 30

- Figura 4.** Frequência média de ocorrência do comportamento enterramento de *L. vannamei*,  $\pm$  intervalo de confiança de 95%, de acordo com os estágios do ciclo muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Os estágios inscritos acima de cada barra representam aqueles em que houve diferença estatística..... 31

- Figura 5.** Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio A do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significante no comportamento entre as fases do fotoperíodo..... 32

- Figura 6.** Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio B do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significante no comportamento entre as fases do fotoperíodo..... 33

- Figura 7.** Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio C do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significante no comportamento entre as fases do fotoperíodo..... 34

**Figura 8.** Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio D<sub>0</sub> do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significativa no comportamento entre as fases do fotoperíodo..... 35

**Figura 9.** Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio D<sub>1</sub> do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significativa no comportamento entre as fases do fotoperíodo..... 36

**Figura 10.** Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio D<sub>2</sub> do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significativa no comportamento entre as fases do fotoperíodo..... 37

**Figura 11.** Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio D<sub>3</sub> do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significativa no comportamento entre as fases do fotoperíodo..... 38

## Manuscrito 2

**Tabela 1.** Tratamentos alimentares aplicados nas fases de claro e de escuro. No tratamento T1, os camarões foram alimentados apenas na 1ª hora da respectiva fase. Assim sucessivamente, até o tratamento T12, quando os camarões foram alimentados apenas na 12ª hora da respectiva fase..... 54

**Figura 1.** Atividade média de protease específica tripsina de *L. vannamei*, expresso em mU.mg<sup>-1</sup> de proteína ± intervalo de confiança de 95 %, de acordo com os tratamentos alimentares e tratamento controle, nas fases de claro e de escuro. Os tratamentos inscritos acima de cada barra representam aqueles em que houve diferença estatística..... 61

**Figura 2.** Atividade média de protease não específica de *L. vannamei*, expresso em U.mg<sup>-1</sup> de proteína ± intervalo de confiança de 95 %, de acordo com os tratamentos alimentares e tratamento controle, nas fases de claro e de escuro. Os tratamentos inscritos acima de cada barra representam aqueles em que houve diferença estatística..... 62

**Figura 3.** Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com o tratamento alimentar T<sub>máx</sub>-claro (tratamento baseado na máxima atividade proteolítica da fase de claro) e T<sub>mín</sub>-claro (tratamento baseado na mínima atividade proteolítica da fase de claro). O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significativa no comportamento entre as fases do fotoperíodo..... 63

**Figura 4.** Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com o tratamento alimentar T<sub>máx</sub>-escuro (tratamento baseado na máxima atividade proteolítica da fase de escuro) e T<sub>mín</sub>-escuro (tratamento baseado na mínima atividade proteolítica da fase de escuro). O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significativa no comportamento entre as fases do fotoperíodo. 64

## Discussão Geral

**Tabela 1.** Hipóteses e resumo das predições e dos resultados correspondentes..... 74

## Anexos

**Tabela 1.** Resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, entre os estágios A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> do ciclo de muda, na fase de claro do fotoperíodo..... 87

**Tabela 2.** Resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, entre os estágios A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> do ciclo de muda, na fase de escuro do fotoperíodo..... 88

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 3.</b> Descrição de média ( $\pm$ erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de <i>L. vannamei</i> , por fases do fotoperíodo, em estágio A do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.....                                                                     | 89 |
| <b>Tabela 4.</b> Descrição de média ( $\pm$ erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de <i>L. vannamei</i> , por fases do fotoperíodo, em estágio B do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.....                                                                     | 90 |
| <b>Tabela 5.</b> Descrição de média ( $\pm$ erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de <i>L. vannamei</i> , por fases do fotoperíodo, em estágio C do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.....                                                                     | 90 |
| <b>Tabela 6.</b> Descrição de média ( $\pm$ erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de <i>L. vannamei</i> , por fases do fotoperíodo, em estágio D <sub>0</sub> do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.....                                                        | 90 |
| <b>Tabela 7.</b> Descrição de média ( $\pm$ erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de <i>L. vannamei</i> , por fases do fotoperíodo, em estágio D <sub>1</sub> do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.....                                                        | 91 |
| <b>Tabela 8.</b> Descrição de média ( $\pm$ erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de <i>L. vannamei</i> , por fases do fotoperíodo, em estágio D <sub>2</sub> do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.....                                                        | 91 |
| <b>Tabela 9.</b> Descrição de média ( $\pm$ erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de <i>L. vannamei</i> , por fases do fotoperíodo, em estágio D <sub>3</sub> do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.....                                                        | 91 |
| <b>Tabela 10.</b> Descrição de média ( $\pm$ DP) e valores máximo e mínimo da atividade de protease específica tripsina de <i>L. vannamei</i> por tratamento alimentar, dentre fases do fotoperíodo. Valores em mU.mg <sup>-1</sup> de proteína.....                                                                                                                                                                                              | 92 |
| <b>Tabela 11.</b> Descrição de média ( $\pm$ DP) e valores máximo e mínimo da atividade de protease não específica de <i>L. vannamei</i> por tratamento alimentar, dentre fases do fotoperíodo. Valores em U.mg <sup>-1</sup> de proteína.....                                                                                                                                                                                                    | 92 |
| <b>Tabela 12.</b> Valores do teste U de Mann-Whitney na comparação da atividade de protease não específica de <i>L. vannamei</i> entre tratamentos alimentares da fase de escuro do fotoperíodo. TC corresponde ao tratamento controle.....                                                                                                                                                                                                       | 93 |
| <b>Tabela 13.</b> Descrição de média ( $\pm$ erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de <i>L. vannamei</i> , por tratamentos alimentares. T <sub>mín</sub> -claro, tratamento baseado na mínima atividade proteolítica da fase de claro. T <sub>máx</sub> -claro, tratamento baseado na máxima atividade proteolítica da fase de claro.....     | 93 |
| <b>Tabela 14.</b> Descrição de média ( $\pm$ erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de <i>L. vannamei</i> , por tratamentos alimentares. T <sub>mín</sub> -escuro, tratamento baseado na mínima atividade proteolítica da fase de escuro. T <sub>máx</sub> -escuro, tratamento baseado na máxima atividade proteolítica da fase de escuro..... | 94 |

## RESUMO

A carcinicultura brasileira é uma atividade consolidada, pois trouxe ganhos econômicos e sociais a vários estados, com a maior produção e área cultivada localizada na região nordeste. Esse fato também se reflete no maior consumo de ração, tornando necessário um manejo alimentar mais eficiente. Atualmente, as técnicas de manejo já prevêm sobra alimentar em decorrência dos processos de muda. Nesse sentido, estudos relacionando fisiologia digestiva, fisiologia da muda e resposta comportamental do camarão podem otimizar o manejo alimentar. Assim, nosso trabalho teve o objetivo de avaliar a resposta comportamental do camarão marinho *L. vannamei* (Crustacea: Penaeidae) de acordo com os estágios do ciclo de muda e com a alimentação baseada em horários de maior ou de menor atividade de enzimas digestivas proteolíticas, bem como investigar a influência do horário de alimentação sobre o índice hepatossomático, atividade de protease específica (tripsina) e não específica. Para tanto, foram realizados três experimentos no Laboratório de Estudos do Comportamento de Camarões – Departamento de Fisiologia da UFRN, em parceria com o Laboratório de Enzimologia – Departamento de Bioquímica da UFPE. Juvenis de *L. vannamei* pesando 5,25 g ( $\pm$  0,25 g), foram mantidos em aquários a uma densidade de 33 camarões m<sup>-2</sup>. No primeiro experimento, os camarões foram alimentados na fase de claro ou na fase de escuro durante 8 dias; no nono dia, os animais foram observados por 15 minutos a cada hora, durante as 12 horas de cada fase do fotoperíodo, sendo registradas as frequências de ocorrência dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento. Ao final da 12ª sessão de observação, foram sacrificados e classificados pelo método da setogênese, nos estágios do ciclo de muda A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> ou D<sub>3</sub>. Como resultado, encontramos que os camarões em estágio A apresentam elevada frequência do comportamento parado. Por outro lado, a frequência de ingestão de alimento foi muito baixa. Os camarões em estágio D<sub>3</sub> também apresentaram baixa ingestão de alimento e elevada inatividade, associada a elevadas frequências de enterramento. No segundo experimento, os camarões foram mantidos em aclimação fisiológica às condições experimentais por 28 dias, distribuídos em 12 tratamentos na fase de claro e 12 tratamentos na fase de escuro. Ao final, os animais foram sacrificados e dissecados para avaliação da atividade de protease específica (tripsina) e atividade de protease não específica. De modo geral, esses parâmetros não variaram entre os animais alimentados na fase de claro e aqueles alimentados na fase de escuro. No entanto, percebemos diferenças significativas na atividade das proteases específica e não específica em relação ao tratamento alimentar. Na fase de claro, as maiores atividades proteolíticas convergiram para a 10ª hora após o início da fase de claro, enquanto as menores atividades convergiram para a 6ª hora após o início dessa fase. Na fase de escuro, as maiores atividades dessas enzimas convergiram para a 12ª hora após o início da fase, enquanto as menores atividades convergiram para a 3ª hora após o início da fase. No terceiro experimento, buscamos avaliar as respostas comportamentais dos camarões a tratamentos alimentares baseados na maior ou menor atividade de enzimas proteolíticas, considerando os resultados do segundo experimento. As categorias comportamentais observadas foram às mesmas do primeiro experimento, com observações de 30 minutos (15min antes e 15min depois da oferta alimentar). Encontramos uma variação na resposta comportamental em função dos tratamentos, com maior ingestão de alimento nos camarões alimentados no horário de maior atividade de enzimas proteolíticas, da fase de claro. Assim, percebemos que eventos periódicos associados à fisiologia dos camarões interferem em suas respostas comportamentais, revelando situações mais propícias à oferta de alimento, capazes de otimizar o manejo alimentar.

## ABSTRACT

Shrimp farming in Brazil is a consolidated activity, having brought economical and social gains to several states with the largest production concentrated in the northeast. This fact is also reflected in higher feed intake, necessitating a more efficient feed management. Currently, management techniques already foresee food loss due to molting. In this sense, studies relating shrimp's digestive physiology, molting physiology and behavioral response of shrimp feed can optimize the feed management. Thus, our study aimed to evaluate the behavioral response of the marine shrimp *L. vannamei* (Crustacea: Penaeidae) in accordance with the stages of moulting cycle and feeding schedules based on higher or lower activity of proteolytic digestive enzymes; also, to investigate the influence of feeding schedule on hepatosomatic index and non-specific and specific protease activity (trypsin). Experiments were carried out at the Laboratory of Shrimp Behavioral Studies at UFRN in partnership with the Laboratory of Enzimology – UFPE. Juveniles of *L. vannamei* weighting 5.25 g ( $\pm$  0.25 g) were kept in aquaria at a density of 33 shrimp m<sup>-2</sup>. In the first experiment, shrimp were fed in the light phase or in the dark phase for 8 days; in the ninth day, the animals were observed for 15 minutes every hour during the 12 hours of each phase of the photoperiod. We recorded the frequency of inactivity, exploration, food intake, burrowing, swimming and crawling behavior. At the end of the 12th observation session, the shrimp were sacrificed and classified by the method of setogenesis in the molt cycle stages A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> or D<sub>3</sub>. We found that the shrimp in A stage show high levels of inactivity. Moreover, the frequency of food intake was very low. The shrimp in D<sub>3</sub> stage also had low food intake and high inactivity associated with elevated frequencies of burrowing. In the second experiment, shrimp were kept in physiological acclimation to experimental conditions for 28 days, distributed in 12 treatments in the light phase and 12 treatments in the dark phase. In the end, the animals were sacrificed and dissected to assess non-specific and specific protease activity (trypsin) activity. In general, these parameters did not vary among animals fed in the light phase and those fed in the dark phase. However, significant differences were found in the activity of specific and nonspecific proteases in relation to food treatment. In the light phase, the major proteolytic activities converged to 10 hours after the start of the light phase, while the lowest activities converged to 6 hours after the beginning of this phase. In the dark phase, the highest enzyme activity converged to 12 hours after the onset of phase, while the lowest activities converged to 3 hours after the onset of phase. In the third experiment, we sought to evaluate the behavioral responses of shrimp in relation to dietary treatments based on higher or lower activity of proteolytic enzymes, considering the results of the second experiment. The behavioral categories observed were the same as the ones in the first experiment, with observations of 30 minutes (15min before and 15min after food supply). We found variation in behavioral responses as a function of the treatments, with greater intake of food in shrimp fed during the period of greatest activity of proteolytic enzymes, in the light phase. Thus we see that periodic events associated with the shrimp's physiology interfere in their behavioral responses, revealing situations that are more adjustable to the provision of food, and consequently optimizing feeding management.

# 1. APRESENTAÇÃO

Nesta tese optou-se por apresentar os trabalhos desenvolvidos em formato de manuscritos para publicação. Para isso, elaboramos uma introdução geral seguida de metodologia geral, objetivos, hipóteses e predições. Logo após, apresentamos os manuscritos seguidos da discussão geral e conclusões gerais.

A introdução geral é composta de uma revisão, onde se fez uma breve descrição do histórico e situação atual da carcinocultura no Brasil, seguido de contextualização e justificativas da necessidade dos estudos comportamentais do camarão marinho *L. vannamei*, com ênfase na influência da fisiologia da muda e da fisiologia digestiva sobre seu perfil comportamental.

Para avaliar essas relações foram desenvolvidos três experimentos, o primeiro relacionou o padrão comportamental com os estágios do ciclo de muda; o segundo avaliou a influência do horário de alimentação sobre parâmetros da fisiologia digestiva, como índice hepatossomático e atividades de proteases digestivas; e o terceiro relacionou o padrão comportamental com horários de alimentação, que foram determinados em função da resposta fisiológica encontrada no segundo experimento. A princípio, esses experimentos originaram dois manuscritos.

No primeiro manuscrito descrevem-se, de forma inédita, as atividades comportamentais relacionadas a cada estágio do ciclo de muda do camarão marinho *L. vannamei*, nas fases de claro e de escuro.

No segundo manuscrito, em um primeiro momento, é avaliada a influência do horário de oferta alimentar em parâmetros da fisiologia digestiva, nas fases de claro e de escuro. Em um segundo momento, após avaliação dos resultados decorrentes dos diferentes horários alimentares, foram considerados dois horários de alimentação (de melhor e pior resposta de

alguns parâmetros da fisiologia digestiva) na avaliação da influência da oferta alimentar sobre o padrão comportamental do camarão, ponderando também o efeito das fases do fotoperíodo nessas respostas comportamentais.

Na discussão geral foi feita uma análise das previsões propostas inicialmente, verificando quais confirmadas, com objetivo de terminar com as conclusões gerais obtidas.

## 2. INTRODUÇÃO GERAL

A aquíicultura é definida como cultivo ou intervenção em uma ou mais fases do ciclo de vida de organismos aquáticos, sendo segmentada em algocultura (cultivo de algas), malacocultura (cultivo de ostras e mexilhões), piscicultura (cultivo de peixes) e carcinocultura (cultivo de crustáceos) (FAO, 1990). O termo carcinocultura é comumente utilizado para designar o cultivo de camarões, pois estes representam 90% dos crustáceos cultivados no mundo. Na carcinocultura, são cultivados predominantemente os camarões da família Penaeidae, principalmente as espécies *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus chinensis* e *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2010).

A carcinocultura mundial cresce em ritmo acelerado desde a década de 1980, devido à insuficiência dos estoques pesqueiros naturais no suprimento da demanda por alimentos e pela consolidação do mercado internacional de camarão cultivado. Na América Latina essa expansão é mais visível devido, até meados da década de 1970, praticamente não existir essa atividade. A partir daí, ocorreram grandes investimentos em produção de camarão no Equador, colocando-o como grande exportador de camarão cultivado da América Latina. Na década de 1990 surgiram algumas “doenças e enfermidades”, dentre elas a síndrome do vírus da mancha branca, causando queda na produção de camarão cultivado daquele país. Esse cenário permitiu que outros países latinos se consolidassem no mercado mundial de camarão cultivado, com México, Honduras e Brasil (FAO, 2010).

No Brasil, a carcinocultura começou a crescer a partir dos anos 80 com a introdução da espécie alóctone *Litopenaeus vannamei* (originária da costa do Pacífico). No entanto, a explosão da carcinocultura brasileira só veio na década de 1990, com a valorização internacional do camarão cultivado. Nesse cenário, a adoção de novas tecnologias na área de manejo dos viveiros de engorda e formulação e produção de rações balanceadas fizeram com que o Brasil alcançasse a maior produtividade (toneladas/hectare/ano) do mundo.

A região Nordeste do Brasil ocupa posição de destaque, pois possui condições climáticas favoráveis, tais como baixa variação na temperatura e incidência solar durante o ano, além de fatores geográficos, como uma ampla costa, que favorece as atividades aquícolas. Isso fez com que as maiores empresas e laboratórios de carcinocultura se instalassem nessa região. Por essa razão, é responsável por mais de 90% da produção de camarão cultivado do Brasil, com destaque para o Rio Grande do Norte e Ceará (ABCC, 2010).

Mesmo assim, a partir de 2004 a produção de camarão cultivado do nordeste brasileiro vem sofrendo sucessivas quedas, principalmente devido a doenças que vem surgindo nesses viveiros, como a síndrome da mionecrose infecciosa. Essa síndrome foi identificada em fazendas do estado do Piauí no ano de 2002 e a partir do ano seguinte se espalhou para os demais estados do nordeste brasileiro, causando mortalidades superiores a 50% dos animais infectados (Pinheiro *et al.*, 2007). Acredita-se que o surgimento dessa doença esteja associado à super-exploração dos ambientes de cultivo e ao manejo inadequado dos viveiros. De acordo com Bachère (2000), a sustentabilidade da indústria camaroneira depende do equilíbrio e da qualidade ambiental.

Dentre os fatores que alteram o equilíbrio ambiental, a principal forma é o efluente dos cultivos de camarões marinhos. Durante o esvaziamento total ou parcial dos viveiros grandes quantidades de nutrientes orgânicos são lançadas nos ecossistemas adjacentes, principalmente compostos nitrogenados. Segundo Jackson *et al.* (2003), em um viveiro comercial, mais de 90% das formas de nitrogênio que entram é sob a forma de ração balanceada para camarão, e 57% desse total é descarregado no ambiente.

O uso de ração balanceada na alimentação dos camarões é feito através de tabelas para o cálculo da quantidade diária de ração, as quais se baseiam no consumo diário, peso médio dos camarões e na biomassa estimada do viveiro. Nesse modelo de alimentação não são

considerados hábitos alimentares ou o estado fisiológico do camarão (Molina *et al.*, 2002). Assim, uma parte da ração ofertada ao camarão não é consumida ou é perdida na lixiviação, degradando a qualidade da água.

Somado a isso, a ração não consumida representa perda econômica para o produtor. Nas fazendas de engorda nordestinas predominam os modelos de cultivo semi-intensivo ou intensivo. Nesses cultivos a ração balanceada representa o maior custo de produção, podendo alcançar até 60% dos custos totais (Rothlisberg, 1998; Cruz-Suárez, 2000; Delgado, 2001; Smith *et al.*, 2002). Mesmo a ração tendo pouca participação na dieta do camarão cultivado, o uso da ração balanceada, bem como seu manejo é preponderante no êxito do cultivo, uma vez que a alimentação dos peneídeos precisa ser complementada, pois a biota natural dos viveiros não suporta densidade populacional acima de 10 cam/m<sup>2</sup>. Segundo Focken *et al.* (1998), a ração representa, em média, apenas 20% do conteúdo estomacal.

Nesse contexto, o entendimento da fisiologia digestiva básica, bem como dos comportamentos envolvidos nesse processo são importantes para investigações sobre a nutrição e ecologia alimentar dos camarões marinhos (Fernández-Gimenez *et al.*, 2001). A digestão é um processo fisiológico que depende da combinação entre processos mecânicos, ativação molecular, reconhecimento e hidrólise do alimento em tempos e estruturas específicas. Nos camarões, a digestão química começa após o bolo alimentar atravessar o esôfago e chegar à câmara anterior do proventrículo do intestino anterior (figura 1). Lá, o alimento é misturado as secreções da glândula do intestino médio (hepatopâncreas), tornando-se continuamente circulante em todo o proventrículo. A trituração e mistura da massa alimentar com o fluido ocorre devido aos movimentos de um mecanismo de trituração, formado principalmente por um ossículo mediano dorsal e dois ossículos laterais, denominado moinho gástrico (Dall e Moriarty, 1983; Ceccaldi, 1997). Em seguida, o fluido escorre pelos sulcos ventrais da câmara anterior até a prensa-filtro (Figura 1), que exclui as partículas

maiores que 1  $\mu\text{m}$ . Finalmente, o fluido entra na abertura do hepatopâncreas para a digestão final e absorção (Dall e Moriarty, 1983; Ceccaldi, 1997; Dall, 1992).

No hepatopâncreas dos camarões três tipos de células serão fundamentais à digestão, são elas: células R (Restzellen) com função de estocagem de nutrientes; células F (Fibrillenzellen), com funções secretoras e as células B (Blasenzellen), que se desenvolvem a partir das células F e possuem um grande vacúolo contendo enzimas digestivas (Passano, 1960; Dall e Moriarty, 1983; Ceccaldi, 1987; Dall, 1992; Ceccaldi, 1997).

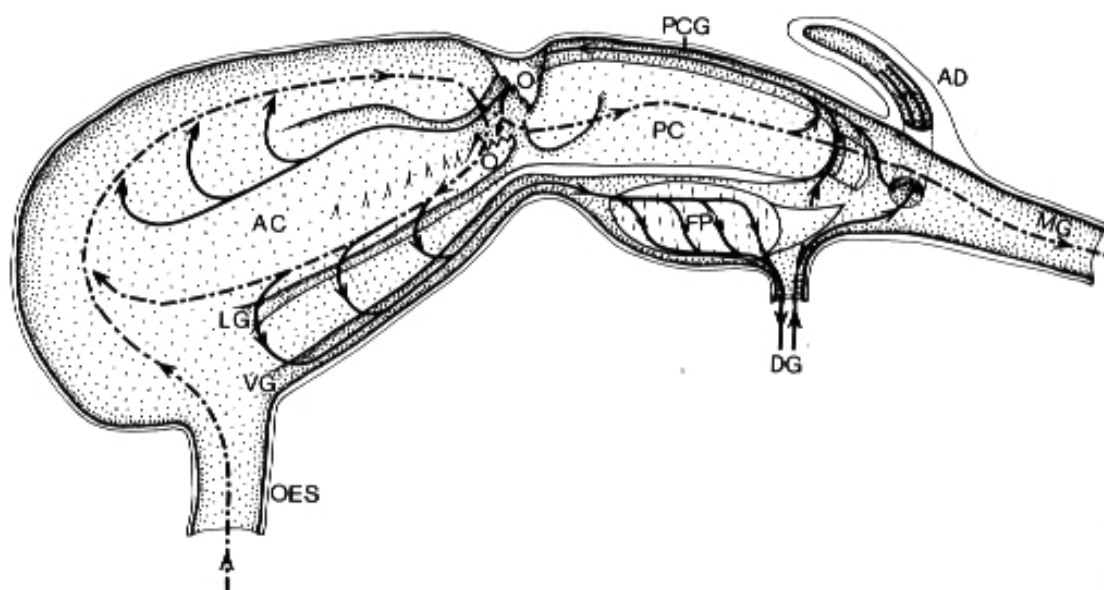


**Figura 1.** Diagrama geral da circulação do fluido da glândula digestiva no proventrículo dos decápodes. Linha pontilhada é o caminho do alimento sólido; linha contínua é o caminho do fluido. Onde AC, câmara anterior; AD, divertículo anterior do intestino médio; DG, abertura para a glândula digestiva; FP, prensa-filtro; LG, sulcos laterais; MG, glândula do intestino médio; O, ossículos do moinho gástrico; OES, esôfago; PC, câmara posterior; PCG, sulcos dorsolaterais da câmara posterior; VG, sulcos ventrais (Reproduzido de Dall e Moriarty, 1983).

As secreções produzidas pelo hepatopâncreas são compostas principalmente por enzimas digestivas (Ceccaldi, 1987). Dentre elas destacam-se as proteases, carbohidrases e lipases. As proteases podem ser endopeptidases, quebram as ligações peptídicas no interior das cadeias protéicas (tripsina e quimotripsina), ou exopeptidases que quebram as ligações aminoterminais, carboxiterminais e dipeptídios (aminopeptidases, carboxipeptidases A e B e dipeptidases). Dentre as enzimas proteolíticas dos camarões, a tripsina é a mais importante por hidrolisar de 50 a 60% da proteína consumida (Dall, 1992). No grupo das carbohidrases

são incluídas as amilases, maltases, sacarases e principalmente a quitinase, que permite a digestão da quitina do próprio exoesqueleto e de microcrustáceos dos quais se alimentam. Além dessas, tem-se encontrado enzimas como a desoxirribonuclease, nuclease e fosfatases alcalinas (Ceccaldi, 1987; Dall e Moriarty, 1983; Dall, 1992; Cruz-Suárez, 2000).

A atividade enzimática é modulada por uma série de fatores, como parâmetros físico-químicos da água (pH, oxigênio, salinidade e temperatura), idade e tamanho do camarão, ingredientes que compõem a dieta, nível e fonte de proteína, aditivos alimentares, frequência alimentar e pela quantidade de alimento (Molina *et al.*, 2000; Llomitoa, 2000). Dentre os fatores internos, a atividade enzimática é influenciada por mudanças morfológicas relacionadas à ontogenia; taxas metabólicas; ritmo circadiano e processos fisiológicos da muda (Dall, 1992; Lemos *et al.*, 2000; Muhlia-Almazán e García-Carreño, 2002).

Córdova-Murueta *et al.* (2004) afirmam que o estresse alimentar representado pela mudança repentina da composição da dieta (como mudança no teor protéico) pode influenciar a atividade da tripsina e quimotripsina em *L. vannamei*, passando a ter a mesma importância que o ciclo de muda na atividade enzimática. Esse trabalho reforça a conclusão do experimento de Muhlia-Almazán e García-Carreño (2002) que afirmaram que o estresse alimentar, representado pela inanição, pode ser tão acentuado quanto o estresse fisiológico causado pelo ciclo da muda.

Variação na atividade enzimática também foi relatada por Molina *et al.* (2000) trabalhando com *L. vannamei* em condições controladas. Detectaram um pico máximo de atividade proteolítica às 14:00 hs e outro de menor intensidade às 02:00 hs, quando alimentados às 12:00 hs e 20:00 hs. Delgado *et al.* (2003) analisaram, em viveiro, a atividade das enzimas digestivas de acordo com o peso corpóreo (de 2 a 12 g), tendo evidenciado que a atividade de protease não específica diminuiu a partir de 6 g.

A enzimologia dos camarões também é muito importante para os estudos que visam à formulação de rações mais baratas. Nessa linha de estudos, os testes de digestibilidade realizados com as enzimas específicas, de cada espécie, representam uma importante ferramenta na busca por ingredientes alternativos e mais baratos para compor as formulações artificiais. Um exemplo disso, foi o trabalho de Cruz-Suàrez *et al.* (2000), que analisaram as proporções ótimas de proteína vegetal/animal nas rações para *L. vannamei* e *L. stylirostris*, encontraram os maiores valores de digestibilidade (92%) para as dietas com a proteína vegetal dominante (soja e trigo).

Além de uma boa digestibilidade, a fonte de proteína utilizada nas formulações artificiais, para ser considerada nutricionalmente adequada, deve ter um baixo efeito inibidor nas proteases digestivas. Nesse sentido, Lemos *et al.* (2004) testaram quatro tipos de farinha de peixe (Brasileira, Chilena, Mexicana e Argentina), farinha de carne, farinha de sangue, farinha de soja e farinha de trigo, como ingredientes de rações para o camarão *Farfantepenaeus paulensis*. E observaram que a farinha de peixe brasileira, farinha de carne e farinha de trigo obtiveram elevados percentuais de digestibilidade, enquanto que os menores valores foram obtidos com a farinha de soja e farinha de sangue, este último, sendo responsável por altos efeitos inibidores das proteases digestivas dos camarões. Lemos *et al.* (2000) mostraram que as respostas das proteases digestivas diferem entre adultos de *Farfantepenaeus californiensis*, *Farfantepenaeus schmitti* e *Litopenaeus vannamei*, evidenciando a propriedade espécie-específica da atividade enzimática, indicando que os testes de digestibilidade devam ser feitos com enzimas específicas da espécie alvo.

Outro fator a ser considerado é a adaptação da atividade enzimática ao conteúdo nutricional da dieta do camarão. Delgado *et al.* (2003) evidenciam uma mudança da atividade enzimática, quando alimentados com dietas de baixo teor protéico. Essa adaptação é enfatizada por Divakaran *et al.* (2004), que submeteram grupos de *L. vannamei* a dietas com

diferentes composições. Encontraram, entre os grupos, diferentes percentuais de digestibilidade para uma dieta controle.

Alguns autores consideram que a adaptação da atividade enzimática pode estar relacionada à existência de isoenzimas, que segundo Lehninger *et al.* (1993), são diferentes proteínas que catalisam a mesma reação. Existem controvérsias quanto as isoenzimas proteolíticas, Ceccaldi (1987) relata a existência de 6 isotripsinas; Dall (1992) e Wormhoudt *et al.* (2000) consideram apenas 5 isotripsinas. Mais recentemente, Sainz *et al.* (2005) analisaram o genótipo, fenótipo e atividade das isotripsinas A, B e C, considerando a isotripsina C como a mais comum.

Outros trabalhos têm relacionado atividade enzimática à fisiologia da muda, como o de Fernández-Gimenez *et al.* (2001). Esses autores relacionaram as proteases digestivas com o ciclo da muda do camarão vermelho *Pleoticus muelleri*. Nesse camarão, considerado carnívoro, foi encontrada baixa atividade de tripsina e quimotripsina na intermuda, que aumentaram na pós-muda. Já Molina *et al.* (2000), trabalhando com *L. vannamei*, encontrou que as atividades específicas de amilases e lipases foram maiores nos estágios D<sub>0</sub> e D<sub>2</sub> e menores em D<sub>3</sub>. Enquanto as proteases digestivas tiveram as maiores atividades nos estágios B, C e D<sub>0</sub>, coincidindo com etapas onde o camarão consumiu 18% mais alimento. Gaxiola *et al.*, (2005) avaliaram os efeitos da salinidade, nível de carboidrato na dieta e ciclo da muda sobre as carbohidrases digestivas de *L. vannamei*, e concluíram que a digestão do amido é favorecida nos estágios C e D<sub>0</sub> do ciclo de muda, pois as maiores concentrações de  $\alpha$ -amilase foram nesses estágios.

O ciclo de muda foi inicialmente dividido em cinco estágios principais, os estágios A e B (pós-muda), C (intermuda), D (pré-muda) e E, esse último estágio é conhecido como a liberação do exoesqueleto ou muda propriamente dita (Passano, 1960). Mais recentemente, Chan *et al.* (1988) descreveram os principais estágios do ciclo da muda de *L. vannamei* como

estágio A (pós-muda recente), B (pós-muda tardia), C (intermuda), D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub> (pré-muda recente) e D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> (pré-muda tardia), desconsiderando o estágio E, devido durar apenas alguns segundos do ciclo. De acordo com a duração da intermuda (Estágio C) em relação à pré-muda (Estágios D) são caracterizados dois tipos de ciclos: o ciclo de muda em anecdise, onde o intervalo de intermuda é maior que o de pré-muda; e o ciclo de muda em diecdise onde o período de intermuda é menor que o de pré-muda. Nesse último grupo, estão inseridos os peneídeos (Smith e Dall, 1985; Robertson *et al.*, 1987; Chan *et al.*, 1988).

O ciclo da muda é um importante processo da fisiologia dos crustáceos, que influi direta ou indiretamente no processo digestivo, bem como na reprodução, metabolismo e comportamento (Passano, 1960). Cesar *et al.* (2006) estudaram mudanças nas concentrações de DNA, RNA, actina e miosina no músculo abdominal do *L. vannamei*, durante os estágios do ciclo de muda. Concluíram que a concentração de DNA aumentou durante a intermuda, provavelmente devido a proliferação celular, e a concentração de RNA aumentou na de pré-muda. Já as fibras de actina e miosina cresceram a partir da pós-muda alcançando um pico na intermuda e diminuíram na pré-muda. Promwikorn *et al.* (2007) avaliaram mudanças na histologia do tegumento relacionadas com o ciclo de muda em *Penaeus monodon*. Concluíram que as células da epiderme variaram em altura e número, estando organizadas e curtas em D<sub>0</sub> e aumentaram a altura do estágio D<sub>1</sub> ao estágio A, voltando a diminuir de altura do estágio B ao C. A sub-epiderme variou na estocagem de carboidratos, proteínas e muco, não existindo em D<sub>0</sub> e aumentando do estágio D<sub>1</sub> ao A até o máximo em D<sub>3</sub> e A, voltando a diminuir a partir de B até o C.

Os estágios de pré-muda tardia (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) e pós-muda (A e B) são caracterizados pela ausência no consumo de alimento, e pela absorção de grandes quantidades de água (Skinner, 1985; Smith e Dall, 1985; Chan *et al.*, 1988; Barnabé, 1996). Esse procedimento cíclico de não-alimentação denomina-se "abstinência fisiológica", podendo estar associada ao

desprendimento do exoesqueleto, com isso algumas estruturas como a boca, esôfago e parte do estômago deixam de ser funcionais. Essas estruturas possuem uma capa de quitina que é continuação das capas externas e no momento da muda essa cobertura quitinosa desprende junto com o antigo exoesqueleto, dificultando o seu funcionamento (Ceccaldi, 1987; Dall, 1992). O desprendimento das capas quitinosas do sistema digestivo começa durante a pré-muda tardia (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Mesmo após a muda, as estruturas digestivas ainda estão muito flexíveis, prejudicando sua funcionalidade até várias horas depois da ecdise (Ceccaldi, 1987; Aguilar-Quaresma, 2000).

Dall (1992) relaciona a abstinência fisiológica, que ocorre durante a muda dos peneídeos, com as respostas das células do hepatopâncreas. Na fase de pós-muda predominam as células F, responsáveis pela secreção de enzimas, e células R, com funções de absorção e estocagem de nutrientes. Assim, o camarão estará pronto para recomeçar a alimentação tão logo sua carapaça esteja enrijecida. Quando a alimentação é restabelecida, aumenta a proporção de células B (responsáveis por absorver pequenas partículas por pinocitose e completar a digestão intracelularmente). Quando o camarão chega aos estágios de pré-muda, as células R tornam-se cada vez mais repletas de lipídios e outros nutrientes, estocando-os em preparação para a muda.

Molina *et al.*, (2000), testando diferentes estratégias de alimentação (tabelas de alimentação, percentual da biomassa e ciclo da muda) em *L. vannamei*, encontraram uma melhor conversão alimentícia e eficiência protéica no grupo de camarões alimentados de acordo com o ciclo de muda. Mesmo com a contínua manipulação dos animais durante o experimento, para estabelecer o estágio de muda da população, a sobrevivência nesse tratamento foi 7,8% maior em detrimento dos demais.

Com relação ao comportamento de camarões brancos, sem sulco adrostral (como *L. vannamei*), pouco se sabe. Uma das primeiras descrições sobre atividades comportamentais

de peneídeos foi feita por Hindley (1975), estudando o *Fenneropenaeus merguensis*. Descreveu o comportamento alimentar, mecanismos de ingestão de alimento, além da estrutura e função dos apêndices alimentares envolvidos. Evidenciando que na busca por alimentos, o camarão introduz os três primeiros pares de pereiópodos no substrato levando itens às estruturas bucais. Hoje, essa atividade alimentar é conhecida como o comportamento de exploração.

Mais recentemente, Pontes *et al.* (2006) definiram algumas categorias de atividades comportamentais de *L. vannamei*, tais como: deslocamento; limpeza; exploração do substrato; inatividade total; inatividade com movimentação dos apêndices; alimentação e natação. Concluindo que natação e exploração ocorrem, preponderantemente, na fase de escuro e a inatividade alternando-se com a exploração predominam na fase de claro. Além disso, a oferta do alimento atuou, tanto na fase de claro como na fase de escuro, como indutor da atividade de exploração do substrato, tornando os camarões mais ativos nos horários posteriores à sua apresentação.

Estudos relacionando o comportamento de *L. vannamei* com a alimentação, vislumbrando o melhor aproveitamento da ração artificial, foram desenvolvidos por Pontes e Arruda (2005) com observações em aquário. Foi observado que a ingestão de alimento foi mais elevada na primeira meia hora após a oferta alimentar, principalmente nos horários da fase de claro. Pontes *et al.* (2008) avaliaram as respostas alimentares do *L. vannamei* alimentados três, quatro ou sete vezes ao dia sob condições laboratoriais. De acordo com esse trabalho, a ingestão de alimento artificial foi mais freqüente nos tratamentos alimentados três vezes ao dia e menos freqüente naqueles alimentados sete vezes ao dia. Lima (2005) relacionou o comportamento (ingestão de alimento artificial, exploração, parado, natação e rastejamento) de *L. vannamei* com a ecdise, observando que todos os comportamentos foram

significativamente diferentes tanto no dia anterior como no dia da ecdise, demonstrando que processos fisiológicos têm grande importância na expressão do comportamento.

Em conclusão, o cultivo de camarões marinhos é uma atividade já consolidada no nordeste brasileiro, pois trouxe ganhos econômicos e sociais para vários estados. No entanto, trouxe também diversos impactos ambientais, como desmatamento (na instalação da fazenda) e descarga de nutrientes orgânicos (durante sua operação). Atualmente, a legislação ambiental vem minimizando alguns impactos e coibindo novas agressões, porém, associado a isso é necessário que a tecnologia de cultivo e de manejo avance para permitir que a carcinicultura continue a trazer benefícios, mas com sustentabilidade.

Nesse sentido, o conhecimento científico é vital para o desenvolvimento de novas tecnologias. As atuais técnicas de manejo já prevêem sobra alimentar, em decorrência dos processos de muda. Porém, não existem trabalhos que avaliem o padrão comportamental de *L. vannamei* com os estágios do ciclo de muda, sendo esse conhecimento de grande importância na elaboração de novas técnicas de manejo. Complementarmente, a avaliação da resposta fisiológica e do padrão comportamental do camarão, alimentado em diferentes horários, trará importantes informações sobre como manejar melhor o alimento. Assim é fundamental o desenvolvimento de pesquisas que explorem o padrão comportamental, o ciclo de muda, a fisiologia digestiva, o manejo alimentar, bem como suas interações, objetivando a sustentabilidade econômica e ambiental dessa atividade.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta comportamental do camarão marinho *L. vannamei* (Crustacea: Penaeidae) de acordo com os estágios do ciclo de muda e com a alimentação baseada em horários de maior ou de menor atividade de enzimas digestivas proteolíticas, assim como investigar a influência do horário de alimentação sobre a atividade de protease específica (tripsina) e não específica.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar os padrões comportamentais de *L. vannamei* de acordo com os estágios do ciclo de muda.
- b) Comparar os padrões comportamentais de *L. vannamei* entre as fases do fotoperíodo, seguindo os estágios do ciclo de muda.
- c) Estudar o efeito de diferentes horários de alimentação sobre a atividade de enzimas digestivas proteolíticas.
- d) Identificar o horário de maior e menor atividade de enzimas digestivas proteolíticas nas fases de claro e de escuro
- e) Comparar o efeito das fases de claro e de escuro sobre a atividade de enzimas digestivas, em animais alimentados em diferentes horários.
- f) Caracterizar os padrões comportamentais de *L. vannamei* alimentados em horários de maior e menor atividade de enzimas digestivas proteolíticas.
- g) Comparar o efeito das fases de claro e de escuro sobre o padrão comportamental de *L. vannamei*, alimentados no horário de maior ou menor atividade de proteases digestivas.

### 3.3 Hipóteses e Predições

Para se atingir os objetivos, foram avaliadas as seguintes hipóteses e predições:

**Hipótese 1** – O padrão comportamental é indicativo do estágio do ciclo de muda dos camarões (manuscrito 1).

**Predição 1.1:** No estágio de intermuda C os camarões expressarão maior frequência de busca e ingestão de alimento, devido o novo exoesqueleto estar totalmente formado.

**Predição 1.2:** No estágio de pós-muda A os camarões apresentarão frequências elevadas do parado e enterramento.

**Predição 1.3:** Nos estágios de pré-muda tardia ( $D_2$  e  $D_3$ ) os camarões também apresentarão elevadas frequências do parado e enterramento.

**Predição 1.4:** O comportamento de ingestão de alimento será reduzido nos estágios de pós-muda A e de pré-muda tardia ( $D_2$  e  $D_3$ ), devido a reabsorção do exoesqueleto.

**Hipótese 2** – A fase do fotoperíodo influencia o padrão comportamental (manuscrito 1).

**Predição 2.1:** Os comportamentos de maior atividade, como natação e exploração, ocorrerão preferencialmente na fase de escuro, enquanto os comportamentos de menor atividade, como parado e enterramento ocorrerão preferencialmente na fase de claro.

**Hipótese 3** – O horário e frequência da oferta do alimento influenciam parâmetros da fisiologia digestiva, tais como as atividades de proteases digestivas (manuscrito 2).

**Predição 3.1:** O tratamento controle apresentará os maiores valores da atividade de proteases digestivas, pois a alimentação foi mais freqüente.

**Predição 3.2:** Os valores da atividade das proteases digestivas flutuarão em função dos horários alimentares.

**Hipótese 4** – Considerando que o padrão comportamental varia entre as fases do fotoperíodo, os parâmetros da fisiologia digestiva também variarão em função das fases do fotoperíodo (manuscrito 2).

**Predição 4.1:** Os valores da atividade das proteases digestivas, de modo geral, serão maiores na fase de escuro.

**Hipótese 5** – O padrão comportamental sofre influencia da interação entre oferta alimentar e atividade de proteases digestivas, nas fases de claro ou de escuro (manuscrito 2).

**Predição 5.1:** Na fase de claro, os camarões apresentarão freqüências mais elevadas de busca e ingestão de alimento quando alimentados em horários de maior atividade de proteases digestivas, em relação aos alimentados em horários de menor atividade.

**Predição 5.2:** Na fase de escuro, assim como na fase de claro, os camarões apresentarão freqüências mais elevadas de busca e ingestão de alimento quando alimentados em horários de maior atividade de proteases digestivas, em relação aos alimentados em horários de menor atividade.

## 4. METODOLOGIA GERAL

Foram realizados três experimentos, o primeiro e o terceiro foram realizados inteiramente no Laboratório de Estudos do Comportamento de Camarões, do Departamento de Fisiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. No segundo experimento, os camarões foram mantidos em condição experimental no mesmo local que os outros dois até a coleta do hepatopâncreas. As análises bioquímicas, conclusivas para esse experimento, foram realizadas no Laboratório de Enzimologia Aplicada da Universidade Federal de Pernambuco.

### 4.1. Material Biológico

Para a realização dos três experimentos foram utilizados camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* (Figura 2) coletados em viveiro comercial da empresa Camarões do Nordeste Ltda (CAMANOR), situada no município de Canguaretama estado do Rio Grande do Norte, apresentando peso médio de 5,25 g ( $\pm$  0,25 g, desvio padrão).

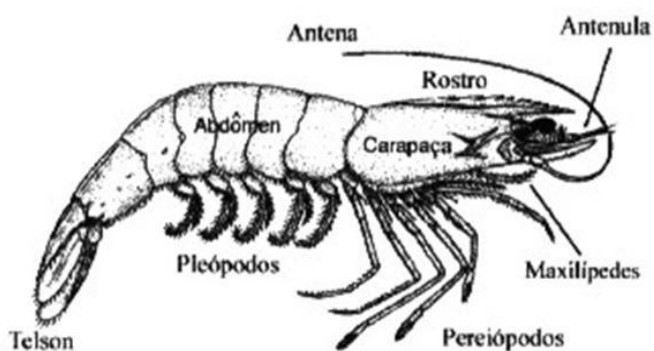


Figura 2 - Fotografia da espécie de estudo (*Litopenaeus vannamei*), associada a desenho esquemático de sua morfologia externa. Fonte: Almeida-Neto (2003).

## 4.2. Unidades Experimentais

No primeiro e terceiro experimentos os animais foram estocados em aquários com dimensões de 50 cm (comprimento) x 30 cm (largura) x 40 cm (altura) (Figura 3). No segundo experimento, os aquários tinham dimensões de 100 cm (comprimento) x 50 cm (largura) x 60 cm (altura). Independente das dimensões, cada aquário tinha o fundo recoberto por placas biológicas, uma camada de lã de fibra de vidro e 5 cm de areia da praia.

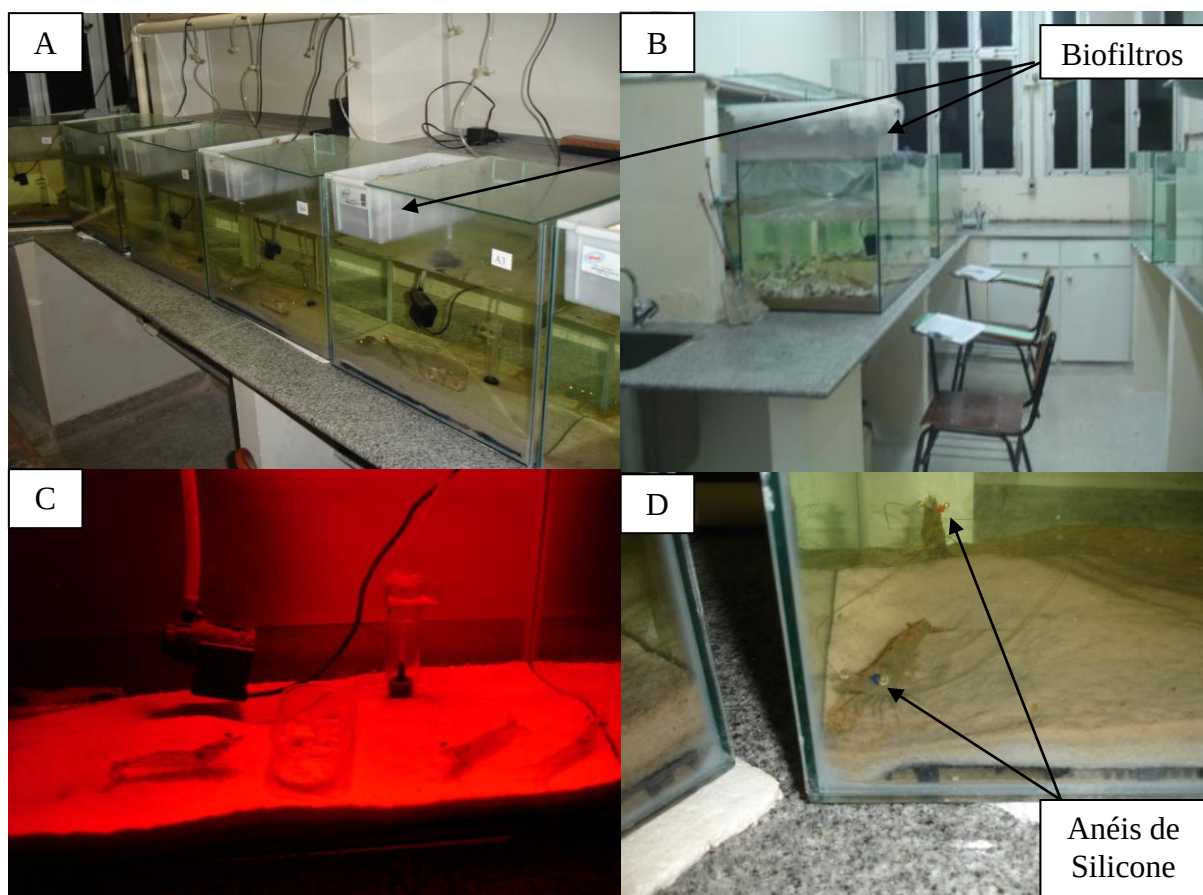


Figura 3. Unidades experimentais usadas nos experimentos 1 e 3 (A) e no experimento 2 (B), destacando os biofiltros utilizados para a manutenção da qualidade da água. Em C temos a unidade experimental observada na fase de escuro e em D, destacamos a marcação com anéis de silicone (azul ou rosa) no pedúnculo ocular.

O oxigênio foi suprido por um sistema de tubos ligados a um soprador radial de  $\frac{1}{4}$  cv, que oxigenava a água através de pedras porosas. Acima de cada aquário foi instalado um biofiltro, composto por camadas de concha de ostra quebrada, areia grossa, areia fina e lã de fibra de vidro. Bombas submersas de sucção, com vazão de  $160 \text{ L.h}^{-1}$ , provia a recirculação de água entre aquário e biofiltro. A qualidade da água foi monitorada diariamente para oxigênio

dissolvido, pH, temperatura e salinidade, sendo mantidos sempre nas seguintes faixas:  $> 5,0$   $\text{mg.L}^{-1}$ ; 7,6 – 8,2; 25,0 – 27,0 °C e 30 – 32 ppm, respectivamente. A amônia tóxica foi monitorada semanalmente através do kit para análise de amônia tóxica em aquários de água salgada da ALCON Ltda, mantendo-se no valor zero após a semana de aclimação. Trocas d'água foram realizadas três vezes por semana, a uma taxa de 20 % do volume total de cada aquário. Os aquários foram mantidos sob fotoperíodo 12:12 horas (claro:escuro), tendo a fase de claro iniciado às 6 horas e a fase de escuro iniciado às 18 horas.

## **5. Experimento I – Relação entre o padrão comportamental dos camarões e estágios do ciclo de muda, nas fases de claro e de escuro.**

### **5.1. Manuscrito 1 – Padrão comportamental em juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (CRUSTACEA: PENAEIDAE), de acordo com os estágios do ciclo de muda e fases do fotoperíodo.**

**Marino Eugênio de Almeida Neto<sup>1</sup>, Priscila Fernandes Silva<sup>2</sup>, Maria de Fátima Arruda<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias, Bananeiras, PB, Brasil. <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Centro de Biociências, Natal, RN, Brasil.

Correspondência: Marino Eugênio de Almeida Neto, Laboratório de Aquicultura, Departamento de Agropecuária do CCHSA/UFPB. Campus Universitário, s/n. CEP: 58220-000, Bananeiras, PB, Brasil, e-mail: marinoalmeida@yahoo.com.br

## **1. INTRODUÇÃO**

Vários processos da vida dos crustáceos, incluindo a alimentação, reprodução, metabolismo, comportamento e a acuidade sensitiva são afetados direta ou indiretamente pelo ciclo da muda (Passano, 1960), cujo desfecho, é a muda ou ecdise. Esse fenômeno biológico é cíclico e possibilita o crescimento desses animais. Porém, é antes e depois da ecdise que ocorre a maioria dos eventos metabólicos associados com a muda e com o crescimento, que incluem a degradação do velho exoesqueleto e síntese do novo exoesqueleto (Skinner, 1985; Robertson *et al.*, 1987; Dall *et al.*, 1990; Chang, 1995).

Nesse contexto, Chan *et al.* (1988), utilizando o método da setogênese, descreveram os principais estágios do ciclo da muda para o camarão branco *Litopenaeus vannamei*. Estágio

de Pós-muda (A); Pós-muda (B); Intermuda (C); Pré-muda recente (D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub>) e pré-muda tardia (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>).

A partir daí, muitos questionamentos foram respondidos acerca dos acontecimentos peculiares de cada estágio do ciclo da muda.

Smith e Dall (1985) e Chan *et al.* (1988) relataram que nos estágios de pré-muda tardia e pós-muda, de *L. vannamei*, o consumo de alimento pára ou diminui. Molina *et al.* (2000), também trabalhando com *L. vannamei*, verificou que as atividades específicas de amilases e lipases foram maiores nos estágios D<sub>0</sub> e D<sub>2</sub> e menores em D<sub>3</sub>. Já as proteases tiveram as maiores atividades nos estágios B, C e D<sub>0</sub>. Gaxiola *et al.* (2005) avaliaram os efeitos do ciclo da muda sobre as carbohidrases digestivas de *L. vannamei*, e concluíram que as maiores concentrações de  $\alpha$ -amilase foram nos estágios C e D<sub>0</sub> do ciclo de muda. Cesar *et al.* (2006), estudando o músculo abdominal do *L. vannamei* durante os estágios do ciclo de muda, encontraram aumento na concentração de DNA na intermuda e de RNA na pré-muda.

Outro foco de atenção tem sido compreender a interação desses animais com o seu ambiente, através do estudo do comportamento. Uma das primeiras descrições sobre atividades comportamentais de peneídeos foi feita por Hindley (1975), estudando *Fenneropenaeus merguensis*. O autor descreveu o comportamento alimentar, mecanismos de ingestão de alimento, além da estrutura e função dos apêndices alimentares envolvidos. Evidenciou que, na busca por alimentos, o camarão introduz os três primeiros pares de pereiópodos no substrato levando itens às estruturas bucais.

Mais recentemente, Pontes *et al.* (2006) definiram algumas categorias de atividades comportamentais de *L. vannamei*: deslocamento; limpeza; exploração do substrato; inatividade total; inatividade com movimentação dos apêndices; alimentação e natação. Os autores concluíram que natação ocorre, predominantemente, na fase de escuro e inatividade ocorre com mais frequência na fase de claro.

Estudos relacionando o comportamento de *L. vannamei* com a alimentação foram desenvolvidos por Pontes e Arruda (2005). Nesse trabalho, foi observado que a ingestão de alimento foi mais elevada na primeira meia hora após a oferta alimentar, principalmente nos horários da fase de claro. Pontes *et al.* (2008) avaliaram as respostas alimentares do *L. vannamei* alimentados três, quatro ou sete vezes ao dia sob condições laboratoriais. A ingestão de alimento artificial foi mais freqüente nos animais alimentados três vezes ao dia e menos freqüente naqueles alimentados sete vezes ao dia. Já Lima (2005) relacionou as categorias comportamentais de ingestão de alimento artificial, exploração, parado, natação e rastejamento de *L. vannamei* com o dia da ecdise. E observou que os comportamentos foram significativamente diferentes no dia da ecdise em relação aos dias anterior e posterior, demonstrando que processos fisiológicos têm grande importância na expressão do comportamento.

Processos fisiológicos envolvidos com a ecdise estão presentes em todo o ciclo de muda, não apenas no momento da liberação do exoesqueleto (Passano, 1960; Skinner, 1985). Nesse sentido, também o padrão comportamental de *L. vannamei* pode ser influenciado pelos eventos fisiológicos que ocorrem em cada estágio do ciclo de muda.

A característica cíclica da muda pode ser relevante na proposição de novas técnicas de manejo ou na reformulação das atuais. Segundo Almeida-Neto e Freire (2007), em juvenis de *L. vannamei*, o ciclo de muda tem duração média de 10 – 13 dias. Indícios do efeito positivo da adaptação das técnicas de manejo, em função da fisiologia do camarão, foram constatados por Molina *et al.* (2000). Nesse experimento, que avaliou diferentes estratégias de alimentação em *L. vannamei*, foi encontrada uma melhor conversão alimentar aparente e eficiência protéica em camarões alimentados de acordo com o ciclo de muda.

O presente trabalho busca observar diferenças no padrão comportamental do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, de acordo com os estágios do ciclo de muda e fases do

fotoperíodo. Esperava-se que camarões em estágio de intermuda (C) apresentariam máxima frequência dos comportamentos exploratórios e de ingestão, enquanto camarões em estágios de pré-muda tardia (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) e pós-muda (A) apresentariam frequências elevadas dos comportamentos parado e enterramento.

## 2. MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Estudos do Comportamento de Camarões, do Departamento de Fisiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Nesse estudo foram utilizados camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* coletados em viveiro comercial da empresa Camarões do Nordeste Ltda. (CAMANOR), situada no município de Canguaretama, estado do Rio Grande do Norte, apresentando peso médio de 5,250 g ( $\pm$  0,250 g, desvio padrão). Os animais foram estocados em aquários com dimensões de 50 cm (comprimento) x 30 cm (largura) x 40 cm (altura), que apresentavam o fundo recoberto por placas biológicas, uma camada de lã de fibra de vidro e 5 cm de areia da praia. O oxigênio foi suprido por um sistema de tubos ligados a um soprador radial de ¼ cv, que oxigenava a água através de pedras porosas.

Acima de cada aquário, numa caixa de 28 cm (comprimento) x 15 cm (largura) x 15 cm (altura), foi instalado um biofiltro, composto por camadas de concha de ostra quebrada, areia grossa, areia fina e lã de fibra de vidro. Bombas submersas de sucção, com vazão de 160 L.h<sup>-1</sup> proviam a recirculação de água entre aquário e biofiltro. A qualidade da água foi monitorada diariamente para oxigênio dissolvido, pH, temperatura e salinidade, sendo mantidos sempre nas seguintes faixas: > 5,0 mg.L<sup>-1</sup>; 7,6 – 8,2; 25,0 – 27,0 °C e 30 – 32 ups, respectivamente. A amônia tóxica foi monitorada semanalmente através do kit para análise de amônia tóxica em aquários de água salgada da ALCON Ltda, não sendo detectada após a

semana de aclimação. Trocas d'água foram realizadas três vezes por semana, a uma taxa de 20 % do volume total de cada aquário, sempre após as coletas de dados. Os aquários foram mantidos com iluminação artificial e sob fotoperíodo 12:12 horas (claro:escuro), tendo a fase de claro iniciado às 6 horas e a fase de escuro iniciado às 18 horas. Os aquários foram divididos em dois ambientes anexos, separados por uma parede, de modo que o primeiro tinha seu fotoperíodo artificial sincronizado com o fotoperíodo natural, enquanto o outro tinha o fotoperíodo artificialmente invertido. Desse modo, foi possível observar ambas as fases do fotoperíodo na mesma sessão de trabalho.

Para realização desse experimento foram conduzidos 2 tratamentos (1 na fase de claro e 1 na fase de escuro, simultaneamente), com 40 repetições cada, inicialmente estocados com 5 camarões. O experimento foi realizado seqüencialmente, sendo realizada, simultaneamente, uma repetição de cada tratamento por vez. Essa rotina experimental ocorreu, consecutivamente, até a conclusão das 40 repetições de cada tratamento. Os camarões foram alimentados 3 vezes ao dia (no 3º, 7º e 11º horários de cada fase) com ração comercial contendo 35 % de proteína bruta, a uma taxa de 15 % da biomassa ao dia. Uma hora e meia após a oferta alimentar, os restos alimentares foram retirados. Para identificação, os camarões estocados foram marcados com anéis de silicone nos pedúnculos oculares direito ou esquerdo nas cores azul ou rosa, restando um camarão não marcado em cada aquário.

Após a estocagem, houve um período de aclimação de 8 dias. No dia seguinte à aclimação, os camarões foram observados em janelas de 15 minutos a cada hora, pelo método focal instantâneo com registro a cada 60 segundos, durante as doze horas referentes ao tratamento. Durante as sessões de observação, o observador movia-se apenas para registrar o comportamento após os 60 segundos. Além disso, o laboratório mantinha-se fechado para evitar interferências no comportamento do animal. Após a última observação, os indivíduos observados foram sacrificados por choque térmico. Nesse momento, ocorre a determinação do

estágio do ciclo de muda pelo método da setogênese. Esse método foi descrito para *L. vannamei* por Chan *et al.* (1988). Nesse experimento, os camarões foram classificados como pertencentes aos estágios A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> ou D<sub>3</sub>.

As categorias comportamentais observadas foram as descritas por Pontes *et al.* (2006): Ingestão de alimento – animal introduzindo ração artificial ou restos de exuvia na cavidade bucal; Exploração – introdução e retirada contínua dos pereiópodos quelados, no substrato, podendo eventualmente levar a boca; Rastejamento – o animal desloca-se sobre o substrato, utilizando seus pereiópodos; Natação – o animal desloca-se horizontalmente ou verticalmente, ou ainda em suspensão na coluna d’água, através do movimento dos pleópodos; Parado – estático, sem movimento nos apêndices locomotores; Enterramento – o animal está com pelo menos a metade do seu corpo totalmente enterrada.

### **Análise estatística dos dados**

Os dados comportamentais não aderiram à distribuição normal nem a homogeneidade das variâncias, comprovados pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Portanto, utilizou-se análise estatística não paramétrica para avaliar o efeito dos estágios do ciclo de muda e fases do fotoperíodo na frequência de registros dos comportamentos.

Para análise dos comportamentos em relação aos estágios do ciclo de muda, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Quando a hipótese de que os grupos pertenciam à mesma população foi rejeitada, utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para comparação dos comportamentos com os estágios do ciclo de muda, dois a dois. Na análise dos comportamentos em função das fases do fotoperíodo utilizou-se o teste U de Mann-Whitney, pois ambas as variáveis são formadas por apenas dois grupos independentes.

Para elaboração dos gráficos, os resultados foram convertidos em média e erro padrão da média. O nível de significância adotado nos testes estatísticos foi  $\leq 5\%$ .

### 3. RESULTADOS

Na fase de claro foram observados 175 camarões, sendo identificados 9 no estágio A, 26 no estágio B, 83 no estágio C, 17 no estágio D<sub>0</sub>, 18 no estágio D<sub>1</sub>, 12 no estágio D<sub>2</sub> e 10 no estágio D<sub>3</sub>. Na fase de escuro foram observados 186 camarões, sendo identificados 17 no estágio A, 27 no estágio B, 75 no estágio C, 25 no estágio D<sub>0</sub>, 17 no estágio D<sub>1</sub>, 14 no estágio D<sub>2</sub> e 11 no estágio D<sub>3</sub>.

#### 3.1 Comportamentos de acordo com o ciclo da muda

**Fase de Claro:** Os animais apresentaram diferenças significativas nos comportamentos parado (Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 181,515$ ; Grau de Liberdade (GL) = 6;  $p \leq 0,000$ ), exploração ( $\chi^2 = 122,321$ ; GL = 6;  $p \leq 0,000$ ), ingestão de alimento ( $\chi^2 = 54,441$ ; GL = 6;  $p \leq 0,000$ ), enterramento ( $\chi^2 = 65,148$ ; GL = 6;  $p \leq 0,000$ ), natação ( $\chi^2 = 83,703$ ; GL = 6;  $p \leq 0,000$ ) e rastejamento ( $\chi^2 = 24,378$ ; GL = 6;  $p \leq 0,000$ ) em função dos estágios do ciclo de muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>).

**Fase de escuro:** Com base no teste de Kruskal-Wallis foram identificadas diferenças significativas nos comportamentos parado ( $\chi^2 = 261,664$ ; Grau de Liberdade (GL) = 6;  $p \leq 0,000$ ), exploração ( $\chi^2 = 180,118$ ; GL = 6;  $p \leq 0,000$ ), ingestão de alimento ( $\chi^2 = 47,925$ ; GL = 6;  $p \leq 0,000$ ), natação ( $\chi^2 = 28,515$ ; GL = 6;  $p \leq 0,000$ ) e rastejamento ( $\chi^2 = 68,310$ ; GL = 6;  $p \leq 0,000$ ) em função dos estágios do ciclo de muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Porém, enterramento não foi estatisticamente diferente entre os estágios do ciclo de muda ( $\chi^2 = 9,022$ ; GL = 6;  $p \leq 0,172$ ).

Na fase de claro, o comportamento **parado** registrou sua maior frequência no estágio de pós-muda A, sendo estatisticamente superior ao encontrado nos demais estágios. A menor frequência de registros desse comportamento ocorreu no estágio de intermuda C, sendo diferente da frequência encontrada nos demais estágios, exceto no estágio D<sub>1</sub> (teste U de Mann-Whitney, Anexo 1, Tabela 1). Os resultados evidenciam a diminuição de ocorrências desse comportamento a partir do estágio A, até atingir o mínimo no estágio C. Nos estágios seguintes, a frequência de registros volta a aumentar até atingir o segundo maior pico no estágio de pré-muda tardia (D<sub>3</sub>) (Figura 1).

O comportamento **parado na fase de escuro**, assim como na fase de claro, registrou maior frequência nos estágios A e D<sub>3</sub>, sendo estatisticamente superiores ao encontrado nos demais estágios. Esse comportamento foi menos registrado no estágio de intermuda C, quando comparado com o encontrado nos demais estágios (teste U de Mann-Whitney, Anexo 1, Tabela 2). O padrão de registros desse comportamento na fase de escuro, ao longo do ciclo da muda, foi semelhante ao da fase de claro. Com diminuição de ocorrências a partir do estágio A e aumento na frequência de registros após o estágio C (Figura 1).

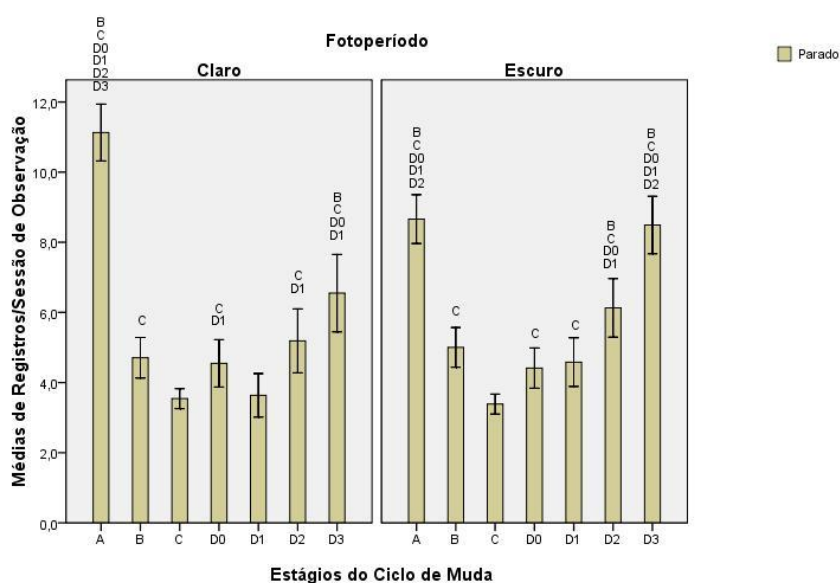


Figura 1. Frequência média de ocorrência do comportamento parado de *L. vannamei*,  $\pm$  intervalo de confiança de 95%, de acordo com os estágios do ciclo muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Os estágios inscritos acima de cada barra representam aqueles em que houve diferença estatística.

O comportamento de **exploração**, na fase de claro, foi estatisticamente mais freqüente no estágio D<sub>1</sub> em relação aos estágios A e D<sub>3</sub>, que, por sua vez, apresentaram as menores freqüências de registros desse comportamento, em relação aos demais estágios. **Ingestão de alimento** foi mais freqüente no estágio B, diferindo das freqüências encontradas em quase todos os outros estágios, exceto no estágio D<sub>1</sub>. A menor freqüência de ingestão de alimento ocorreu no estágio A, diferindo das freqüências encontradas nos demais estágios, exceto no estágio D<sub>3</sub> (teste U de Mann-Whitney, Anexo 1, Tabela 1).

Na fase de escuro, o comportamento **exploração** foi mais freqüente no estágio C, sendo estatisticamente superior ao encontrado nos demais estágios. Enquanto a menor freqüência de registros desse comportamento ocorreu no estágio A, diferindo da encontrada nos demais estágios, exceto do estágio D<sub>3</sub>. **Ingestão de alimento** foi mais freqüente no estágio B, sendo superior ao encontrado nos estágios A e D<sub>3</sub>, que, por sua vez, apresentaram as menores freqüências de registros desse comportamento em relação aos demais estágios (teste U de Mann-Whitney, Anexo 1, Tabela 2).

Em ambas as fases, inversamente ao encontrado no comportamento parado, a freqüência de registros de exploração e ingestão de alimento foi maior a partir do estágio A. Alcançando elevadas freqüências em B, C, D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub> e, em seguida, sendo menos registrados até o mínimo em D<sub>3</sub> (Figura 2).

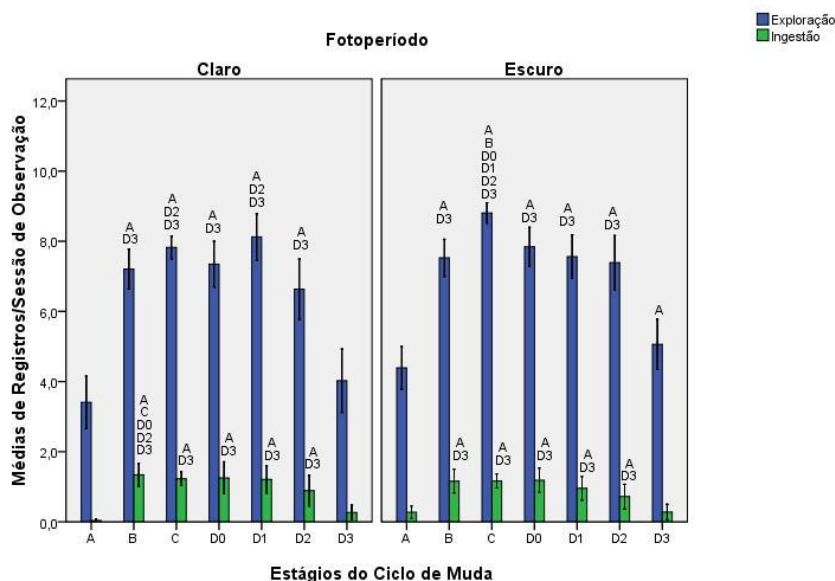


Figura 2. Frequência média de ocorrência dos comportamentos exploração e ingestão de alimento de *L. vannamei*,  $\pm$  intervalo de confiança de 95%, de acordo com os estágios do ciclo muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Os estágios inscritos acima de cada barra representam aqueles em que houve diferença estatística.

Na fase de claro, o comportamento **Natação** foi mais freqüente no estágio C, sendo estatisticamente diferente das freqüências encontradas nos estágios de pós-muda A, B e pré-muda D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>. A freqüência de registros do comportamento natação não diferiu nos estágios A e D<sub>3</sub>, sendo estatisticamente menos freqüentes que as encontradas nos demais estágios. O comportamento **rastejamento** foi estatisticamente mais freqüente no estágio D<sub>2</sub>, diferente do encontrado nos estágios A e D<sub>3</sub>. A menor freqüência desse comportamento foi registrada em D<sub>3</sub>, diferente das freqüências encontradas nos estágios C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> (teste U de Mann-Whitney, Anexo 1, Tabela 1). A freqüência de registros na fase de claro, dos comportamentos natação e rastejamento, mostram tendência semelhante aos comportamentos exploração e ingestão de alimento. Alcançando elevadas freqüências nos estágios C, D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub>, em seguida sendo menos registrados até o mínimo em D<sub>3</sub> (Figura 3).

Na fase de escuro, a freqüência de registros do comportamento **natação** no estágio D<sub>1</sub> foi estatisticamente superior as freqüências encontradas nos demais estágios, exceto do encontrado nos estágios C e D<sub>0</sub>. A menor freqüência desse comportamento foi encontrada no estágio D<sub>2</sub>, diferindo do encontrado nos estágios C, D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub>. O comportamento **rastejamento**

foi mais freqüente no estágio A, sendo estatisticamente superior ao encontrado nos demais estágios. Enquanto a menor freqüência desse comportamento, também encontrada no estágio D<sub>2</sub>, diferiu do encontrado nos estágios A, B, D<sub>1</sub> e D<sub>3</sub> (teste U de Mann-Whitney, Anexo 1, Tabela 2). Percebe-se que nessa fase do fotoperíodo, os comportamentos natação e rastejamento apresentam uma distribuição irregular. A natação diminui de freqüência nos estágios B e D<sub>0</sub>, com mínimo no estágio D<sub>2</sub>, enquanto o rastejamento diminui de freqüência entre os estágios A e C, em seguida volta a aumentar a freqüência entre C e D<sub>1</sub>, voltando a diminuir de freqüência em D<sub>2</sub> (Figura 3).

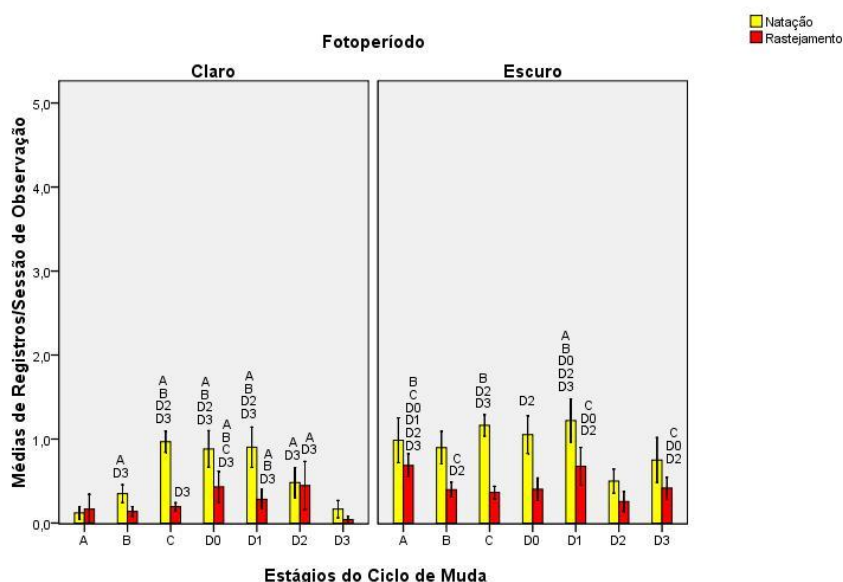


Figura 3. Freqüência média de ocorrência dos comportamentos natação e rastejamento de *L. vannamei*,  $\pm$  intervalo de confiança de 95%, de acordo com os estágios do ciclo muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Os estágios inscritos acima de cada barra representam aqueles em que houve diferença estatística.

Entre todos os resultados, o mais enfático foi o observado no comportamento de **enterramento**. Na fase de claro foi registrado em todos os estágios. Porém, entre os estágios de pré-muda a freqüência de registros foi crescente até o máximo no estágio D<sub>3</sub>, sendo estatisticamente mais freqüente que nos outros estágios. A menor freqüência de registros desse comportamento ocorreu no estágio A, que diferiu estatisticamente do registrado nos outros estágios, exceto em D<sub>0</sub> (teste U de Mann-Whitney, Anexo 1, Tabela 1). A distribuição do comportamento enterramento, entre os estágios do ciclo de muda, foi diferente da

distribuição dos demais comportamentos. Percebe-se uma frequência mínima no estágio A (imediatamente após a ecdise) e a partir do estágio de pré muda D<sub>0</sub> a frequência de registros aumenta, até alcançar frequência máxima no estágio imediatamente antes da ecdise (D<sub>3</sub>) (Figura 4).

Por outro lado, na fase de escuro, esse comportamento é registrado em frequências muito baixas. Nessa fase do fotoperíodo, os testes estatísticos revelaram não haver diferenças estatísticas na ocorrência do enterramento entre os estágios do ciclo de muda (teste U de Mann-Whitney, Anexo 1, Tabela 2). Os resultados indicam uma forte influência da fase do fotoperíodo na expressão do comportamento de enterramento. E considerando apenas a fase de claro, os resultados indicam uma forte influência dos estágios do ciclo de muda na expressão do comportamento de enterramento (Figura 4).

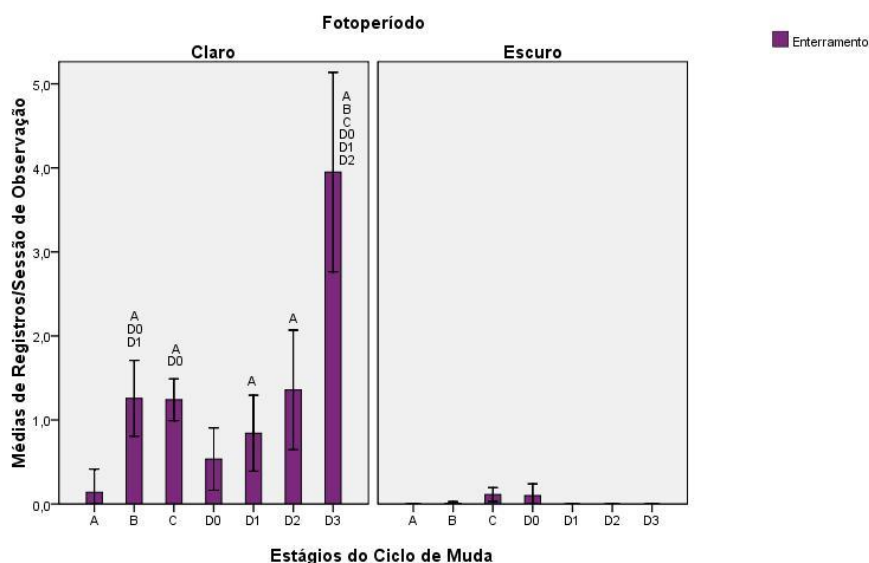


Figura 4. Frequência média de ocorrência do comportamento enterramento de *L. vannamei*,  $\pm$  intervalo de confiança de 95%, de acordo com os estágios do ciclo muda (A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>). Os estágios inscritos acima de cada barra representam aqueles em que houve diferença estatística.

### 3.2 Comportamentos por estágios do ciclo de muda

#### 3.2.1 Padrão comportamental no Estágio A, de acordo com o fotoperíodo

Animais em estágio A do ciclo de muda expressaram comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, natação e rastejamento tanto na fase de claro como na fase de escuro. O teste U de Mann-Whitney revelou diferenças estatísticas nos comportamentos parado, natação e rastejamento de acordo com o fotoperíodo, sendo os comportamentos natação e rastejamento mais freqüentes na fase de escuro (teste U de Mann-Whitney, Anexo 2, Tabela 3). O comportamento parado foi o mais freqüente neste estágio, alcançando 74,2 % dos registros na fase de claro e 57,7 % dos registros da fase de escuro (Figura 5). Os comportamentos exploração e ingestão de alimento, mesmo não sendo estatisticamente diferentes, tendem a ser mais freqüentes na fase de escuro, já enterramento foi registrado apenas na fase de claro.

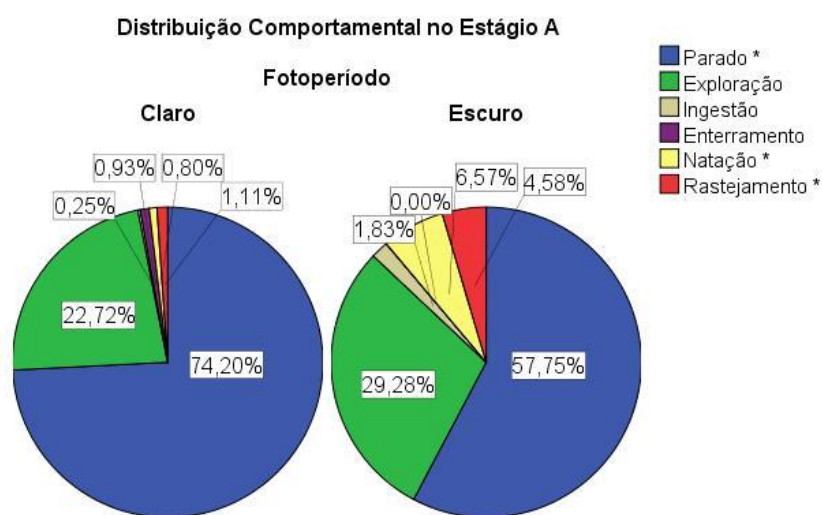


Figura 5. Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio A do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significativa no comportamento entre as fases do fotoperíodo.

### 3.2.2 Padrão comportamental no estágio B, de acordo com o fotoperíodo

No estágio B, todas as categorias comportamentais foram registradas em ambas as fases do fotoperíodo. A freqüência de ocorrência dos comportamentos ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento foram estatisticamente diferentes entre as fases do fotoperíodo. Os dois primeiros comportamentos foram mais freqüentes na fase de claro,

enquanto os dois últimos foram mais freqüentes na fase de escuro (teste U de Mann-Whitney, Anexo 2, Tabela 4). O comportamento mais freqüente do estágio B foi exploração, com 50,21 % na fase de escuro e 48,07 % na fase de claro. Ingestão de alimento foi o terceiro comportamento mais freqüente deste estágio com 8,94 % e 7,74 % nas fases de claro e escuro, respectivamente. A freqüência de registro desse comportamento, na fase de claro, foi o mais elevado de todo o experimento (Figura 6).

Em relação ao estágio A, constata-se uma diminuição na freqüência de registros de parado e paralela elevação na freqüência registros de exploração, ingestão de alimento e enterramento, ocorrido de modo semelhante em ambas as fases do fotoperíodo.

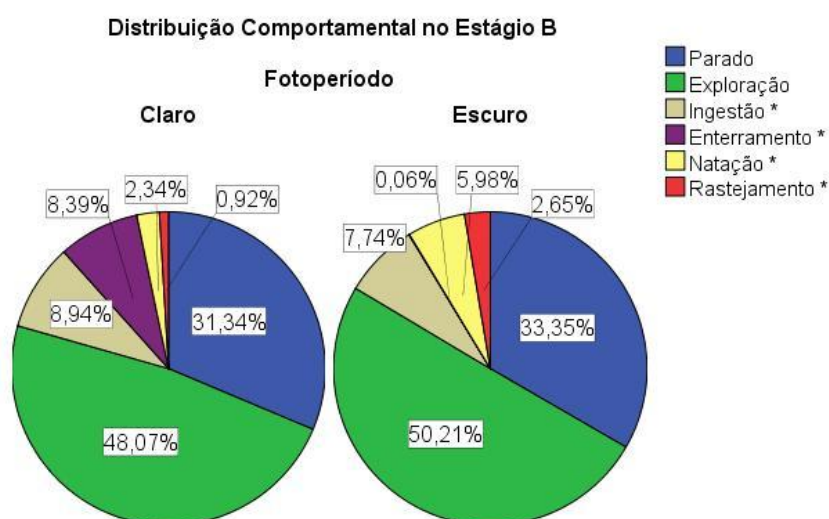


Figura 6. Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio B do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significativa no comportamento entre as fases do fotoperíodo.

### 3.2.3 Padrão comportamental no estágio C, de acordo com fotoperíodo

No estágio C, a freqüência de ocorrências dos comportamentos exploração, enterramento, nataçã e rastejamento foram estatisticamente diferentes entre as fases do fotoperíodo. Com exploração, nataçã e rastejamento mais freqüentes na fase de escuro, enquanto enterramento foi predominantemente registrado na fase de claro (teste U de Mann-Whitney, Anexo 2, Tabela 5). A distribuição de comportamentos no estágio C foi semelhante

ao encontrado no estágio B. O comportamento mais freqüente foi exploração, com 58,63 % na fase de escuro e 52,17 % na fase de claro, seguido por parado com 23,62 % na fase de claro e 22,57 % na fase de escuro (Figura 7).

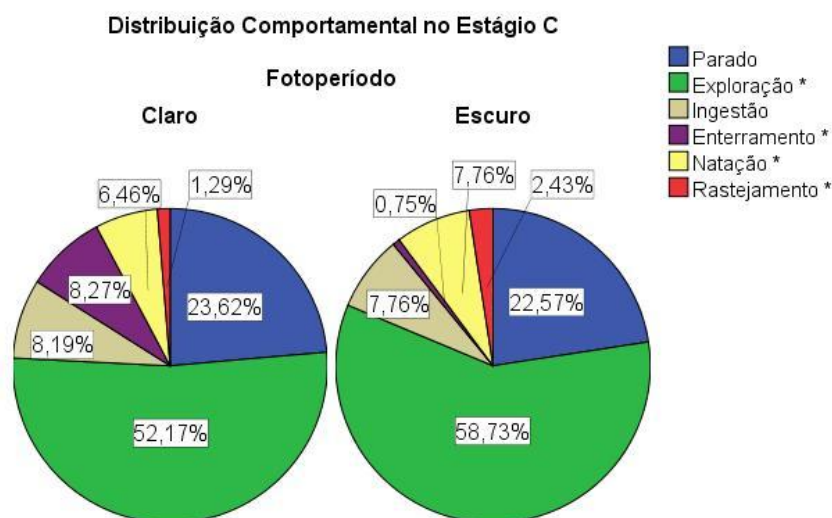


Figura 7. Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio C do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significativa no comportamento entre as fases do fotoperíodo.

### 3.2.4 Padrão comportamental no estágio D<sub>0</sub>, de acordo com o fotoperíodo

No estágio D<sub>0</sub>, as freqüências de ocorrências de todos os comportamentos foram estatisticamente semelhantes, exceto enterramento, mais freqüente na fase de claro (teste U de Mann-Whitney, Anexo 2, Tabela 6). A distribuição de comportamentos no estágio D<sub>0</sub> foi semelhante ao encontrado nos estágios B e C. O comportamento mais freqüente foi exploração, representando 48,99 % dos registros comportamentais da fase de claro e 52,29 % da fase de escuro, seguido por parado com 30,33 % na fase de claro e 29,42 % na fase de escuro. Ingestão de alimento foi o terceiro comportamento mais freqüente deste estágio com 8,37 % e 7,91 % nas fases de claro e escuro, respectivamente (Figura 8).

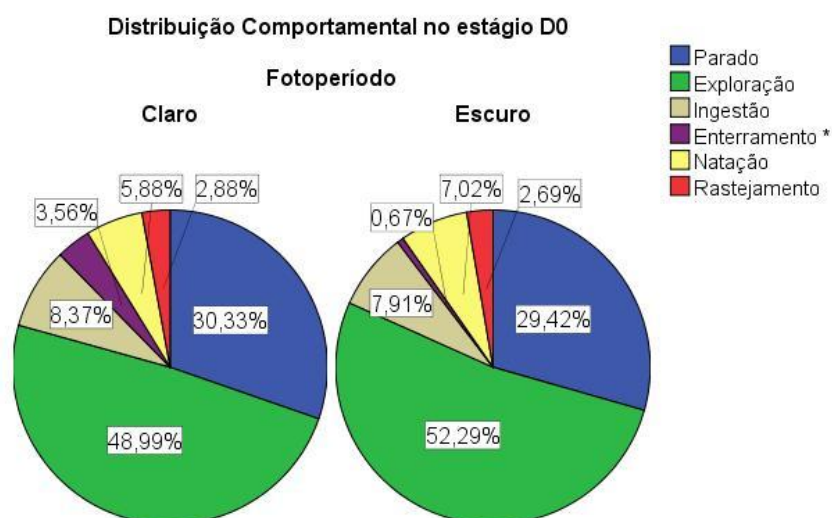


Figura 8. Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio D<sub>0</sub> do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significativa no comportamento entre as fases do fotoperíodo.

### 3.2.5 Padrão comportamental no estágio D<sub>1</sub>, de acordo com o fotoperíodo

No estágio D<sub>1</sub>, a frequência de ocorrências dos comportamentos parado, enterramento, natação e rastejamento foram estatisticamente diferentes entre as fases do fotoperíodo. Com parado, natação e rastejamento mais frequentes na fase de escuro, enquanto enterramento foi registrado apenas na fase de claro (teste U de Mann-Whitney, Anexo 2, Tabela 7). A distribuição de comportamentos no estágio D<sub>1</sub> diferiu do encontrado nos estágios B, C e D<sub>0</sub>. O comportamento mais frequente continuou sendo exploração, com 54,17 % na fase de claro e 50,42 % na fase de escuro, seguido por parado com 24,25 % na fase de claro e 30,56 % na fase de escuro. Ingestão de alimento foi o terceiro comportamento mais frequente deste estágio apenas da fase de claro, com 8,06 %. Enquanto natação foi o terceiro comportamento mais frequente da fase de escuro, com 8,14 % (Figura 9).

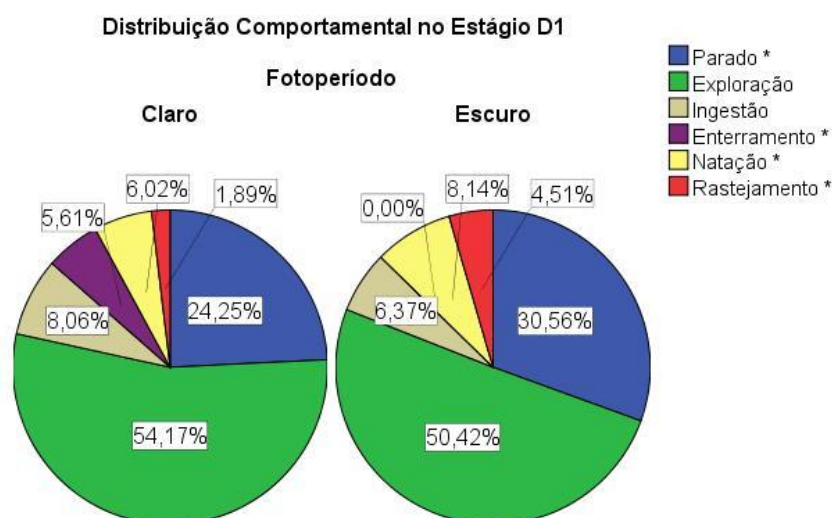


Figura 9. Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio D<sub>1</sub> do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significante no comportamento entre as fases do fotoperíodo.

### 3.2.6 Padrão comportamental no estágio D<sub>2</sub>, de acordo com o fotoperíodo

No estágio D<sub>2</sub>, as frequências de ocorrências de todos os comportamentos foram estatisticamente semelhantes, exceto enterramento freqüente na fase de claro e não registrado na fase de escuro (teste U de Mann-Whitney, Anexo 2, Tabela 8). A distribuição de comportamentos da fase de escuro do estágio D<sub>2</sub> foi semelhante ao encontrado nos estágios B, C e D<sub>0</sub>. O comportamento mais freqüente foi exploração, com 49,29 %, seguido por parado com 40,87 % e o terceiro comportamento mais freqüente deste estágio na fase de escuro foi ingestão de alimento, com 4,80 %. Na fase de claro, exploração foi o mais freqüente com 44,24 % dos registros, seguido por parado com 39,59 % e o terceiro comportamento mais freqüente deste estágio na fase de claro foi enterramento, com 9,04% (Figura 10).

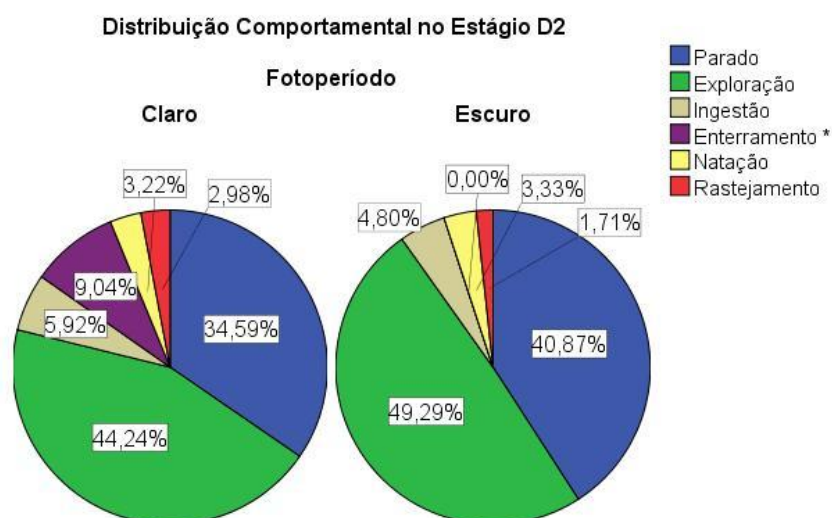


Figura 10. Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio D<sub>2</sub> do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significante no comportamento entre as fases do fotoperíodo.

### 3.2.7 Padrão comportamental no estágio D<sub>3</sub>, de acordo com o fotoperíodo

No estágio D<sub>3</sub>, as frequências de ocorrências de todos os comportamentos foram estatisticamente diferentes, exceto ingestão de alimento (teste U de Mann-Whitney, Anexo 2, Tabela 9). Os comportamentos parado, exploração, natação e rastejamento foram mais frequentes na fase de escuro, enquanto enterramento foi registrado apenas na fase de claro deste estágio. Nessa fase, o comportamento parado foi mais frequente, em ambas as fases. O comportamento enterramento não foi registrado na fase de escuro, enquanto na fase de claro esse comportamento alcançou 26,33 % dos registros, esse percentual foi o máximo encontrado entre todos os estágios (Figura 11).

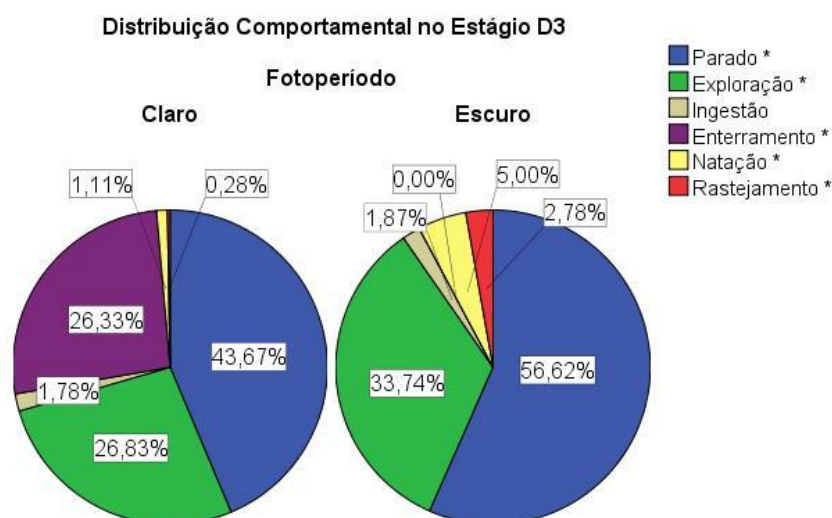


Figura 11. Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com as fases do fotoperíodo (fases de claro e de escuro), em estágio D<sub>3</sub> do ciclo de muda. O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significante no comportamento entre as fases do fotoperíodo.

#### 4. Discussão

Os comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastreamento, expressados por *L. vannamei*, variaram em função do estágio do ciclo de muda e da fase do fotoperíodo. Mesmo assim, a influência desses fatores sobre os comportamentos não foi uniforme. Aparentemente, houve maior influência do ciclo da muda sobre o parado, exploração e ingestão de alimento; maior influência do fotoperíodo sobre a natação e rastreamento; e de ambos sobre o enterramento.

O comportamento que caracteriza o estágio de pós-muda A, é o parado. Esse comportamento é o mais freqüente nas fases de claro e de escuro. A inatividade provavelmente ocorre devido à vulnerabilidade dos crustáceos nesse momento, assim como com a necessidade do animal de captar água para expandir o exoesqueleto. Porém, na fase de claro os camarões são mais parados que na fase de escuro. Essa diferença existe, pois a ausência de luz da fase de escuro oferece mais segurança contra possíveis predadores, permitindo a expressão de outros comportamentos. Outra característica comportamental desse estágio é a menor freqüência de exploração, ingestão de alimento e enterramento dos

camarões, que não variam com o fotoperíodo. A baixa frequência desses comportamentos deve estar relacionada à completa flacidez do exoesqueleto, característica desse estágio, que dificulta a manipulação e trituração do alimento, bem como a movimentação de substrato na exploração e enterramento.

Barnabé (1996) relata que o animal que acaba de mudar precisa estar exposto à água, pois a absorve lentamente, encaminhando-a ao interior dos tecidos e do hepatopâncreas. Skinner (1985) e Chang (1995) afirmam que a água captada no estágio A tem o objetivo de expandir o flácido novo exoesqueleto, através do aumento de volume interno, garantindo o espaço necessário à construção dos tecidos nos estágios seguintes antes do enrijecimento do mesmo. Chang (1995) também relata que os crustáceos são extremamente vulneráveis após a ecdise, com a mobilidade e o uso dos apêndices de defesa limitados. A inatividade dos camarões nesse estágio também é descrita para *L. vannamei* por Chan *et al.* (1988); além disso, os autores também classificam os camarões em estágio A como fracos e com exoesqueleto macio.

O estágio de pós-muda B é caracterizado pela retomada da alimentação e de atividades de exploração, em contraponto à diminuição dos registros de animais parados. O aumento na frequência de alimentação, exploração e também enterramento deve estar ligada ao processo de recalcificação do exoesqueleto. Com o exoesqueleto mais rígido, é possível introduzir os pereiópodos no substrato em busca de alimento e movimentá-lo permitindo o enterramento. Além do mais, o exoesqueleto mais rígido permite a manipulação e trituração do alimento. No estágio de intermuda C, a frequência de alimentação se mantém elevada, porém menor que o encontrado no estágio B. Nesse estágio, a exploração atinge a frequência máxima, enquanto o parado atinge a mínima.

Alguns autores divergem quanto ao início da recalcificação do exoesqueleto dos peneídeos, porém a maioria afirma que a recalcificação do exoesqueleto inicia no estágio B.

Barnabé (1996) considera o início da recalcificação do exoesqueleto no estágio B, completada no estágio C. Smith e Dall (1985) relatam, em *Penaeus esculentus*, que o processo de recalcificação inicia no estágio B do ciclo de muda. Passano (1960) afirma que a recalcificação do novo exoesqueleto começa poucas horas após a ecdise, às vezes, ainda no estágio A. Chan *et al.* (1988) também descrevem o início da recalcificação no estágio B, sendo completada no estágio C, associando os estágios da muda com a alimentação e “atividade”. No entanto, relatam que no estágio B não há alimentação e a atividade está recomeçando, enquanto no estágio C a alimentação e atividade são consideradas máximas. Porém, não especificam a metodologia usada na mensuração da atividade ou alimentação. Por outro lado, a temperatura média nesse experimento esteve entre 20 – 22 °C, podendo ter influenciado o metabolismo e conseqüentemente as “atividades”.

Em nosso estudo, a alta taxa de ingestão de alimento encontrada no estágio B, pode ter relação com a necessidade de restabelecimento da homeostase do camarão, tão logo seja possível, pois nos estágios anteriores (A e D<sub>3</sub>) a ingestão de alimento foi muito reduzida. Sánchez-Paz *et al.* (2007) avaliaram o efeito de curtos períodos de inanição sobre as reservas de energia do hepatopâncreas e do plasma de *L. vannamei*. Submeteram os camarões a períodos de inanição de 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, sendo realimentados após 120 horas de inanição, com objetivo de simular a abstinência fisiológica ocorrida em alguns estágios do ciclo de muda. Foram analisados o glicogênio, glicose, proteína solúvel, lipídios, esteróis e acilglicerídios. Dentre outros resultados, foi encontrado que a partir de 24 horas de inanição a glicose e o glicogênio estavam significativamente menores que o controle, porém, quando a alimentação foi restabelecida, os níveis de glicose e glicogênio superaram o encontrado no controle. Cheng *et al.* (2002), avaliando os níveis de proteína, oxihemocianina, eletrólitos e osmolalidade na hemolinfa, de acordo com os estágios do ciclo de muda de *L. vannamei*, relataram que todos os parâmetros estudados apresentaram os menores níveis no

estágio de pós-muda A, com os níveis de proteína e oxihemocianina significativamente maiores no estágio B.

Os estágios de pré-muda recente D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub> coincidiram com o recomeço da inatividade dos camarões, bem como, com a diminuição das ocorrências de busca e ingestão de alimento. O estágio D<sub>0</sub> é identificado pela apólise, que por sua vez, marca o início da preparação para a próxima muda (Chan *et al.*, 1988). A apólise pode ser a razão da discreta mudança na expressão desses três comportamentos. Esse fenômeno é caracterizado pelo desprendimento entre epitélio e estruturas calcificadas do tegumento do camarão. Com o desprendimento, o epitélio começa a secretar o líquido da muda, composto basicamente por quitinases e fosfatases, para reabsorver componentes do velho exoesqueleto. Em decorrência disso, a concentração de glicogênio começa a diminuir, enquanto o consumo de oxigênio aumenta sensivelmente (Skinner, 1985; Barnabé, 1996).

No estágio de pré-muda tardia D<sub>2</sub>, a secreção do líquido da muda se intensifica. Com isso o exoesqueleto fica amolecido, podendo explicar o aumento da frequência do comportamento parado, em detrimento da diminuição da frequência de busca e ingestão de alimento. A reabsorção de componentes do velho exoesqueleto se completa no estágio D<sub>3</sub>, imediatamente antes da ecdise. Nesse estágio, a frequência dos comportamentos parado, exploração e ingestão de alimento se assemelha ao encontrado no estágio A, talvez devido às estruturas envolvidas na busca e ingestão de alimento estarem descalcificadas, assim como no estágio A. Dall (1992) relata que os camarões param de ingerir alimento devido a perda das estruturas calcificadas do moinho gástrico (estrutura presente no proventrículo e essencial para a digestão dos peneídeos), que são liberadas com a exúvia e precisam ser recalcificadas junto com o exoesqueleto.

Os comportamentos natação e rastejamento, mesmo variando em função do estágio do ciclo de muda, o expressaram de forma diferente quando consideramos as fases do

fotoperíodo. Na fase de claro, os camarões nadaram mais nos estágios C, D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub> e menos nos estágios de pós-muda (A e B) e pré-muda tardia (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>), enquanto na fase de escuro nadaram freqüentemente em quase todos os estágios, exceto no estágio D<sub>2</sub>.

Corroborando nossos resultados sobre a natação e rastejamento, Pontes e Arruda (2005) estudando o comportamento de *L. vannamei* em função da oferta alimentar nas fases de claro e escuro, afirmam que os camarões nadam em ambas as fases, porém com maior freqüência na fase de escuro. Pontes *et al.* (2006), descrevendo o padrão de atividade diária de juvenis de *L. vannamei* em condições laboratoriais, relatam que a natação ocorre predominantemente na fase de escuro. Hindley (1975) investigou os efeitos do fotoperíodo na atividade locomotora do *Fenneropenaeus merguensis*, encontrando que a atividade locomotora foi maior na fase de escuro, mas não restrita a ela.

Quanto ao comportamento de enterramento, verificamos níveis muito reduzidos no estágio de pós-muda A e crescente entre os estágios de pré-muda, porém ocorrendo basicamente na fase de claro. O padrão comportamental de camarões em estágio D<sub>3</sub> é muito semelhante ao de camarões em estágio A, exceto pelo comportamento de enterramento, que é reduzido no estágio A e muito freqüente no estágio D<sub>3</sub>, ainda assim apenas na fase de claro. Mesmo estando vulneráveis, os camarões praticamente não se enterram no estágio A, pois precisam manter a captação de água. Assim permanecem parados sobre o substrato, dificultando ser detectados por predadores e permanecendo preparados para uma fuga imediata. O fato dos camarões se enterrarem freqüentemente apenas na fase de claro e, sobretudo em estágio D<sub>3</sub>, reflete a combinação de benefícios desse comportamento. O enterramento em estágios de pré-muda promove a proteção necessária devido à vulnerabilidade, decorrente dos processos de descalcificação do exoesqueleto somada à exposição natural que ocorre na fase de claro. Ao mesmo tempo otimiza o gasto energético, promovendo uma latência importante para a canalização da energia aos processos fisiológicos

envolvidos com a reabsorção do velho exoesqueleto e a síntese do novo. Por outro lado, Dall *et al.* (1990) relata que o enterramento previne o stress termal.

Os peneídeos com sulco adrostral apresentam padrão de atividades similar, sendo ativos durante a fase de escuro e se enterrando durante o dia. Enquanto que os peneídeos sem sulco adrostral, que inclui o *L. vannamei*, são ativos tanto durante a fase de claro como na fase de escuro e usualmente não se enterram na fase de claro. De acordo com Penn (1984) os peneídeos podem ser classificados em: fortemente noturno e sempre enterrado durante o dia (*Farfantepenaeus duorarum* e *Farfantepenaeus brasiliensis*); Geralmente noturno, sendo ativo durante a noite e ocasionalmente emergindo durante o dia (*Farfantepenaeus aztecus* e *Penaeus monodon*); e raramente enterrado, sendo continuamente ativo (*Litopenaeus setiferus*, *Litopenaeus schmitti* e *Litopenaeus vannamei*).

Sabe-se que no manejo adotado pelas fazendas de cultivo de camarão marinho, ao longo do ciclo de cultivo, ocorre a redução da oferta alimentar em função da sobra de ração. Os carcinicultores atribuem essa sobra à muda dos camarões.

Podemos afirmar que, em *L. vannamei*, a ingestão de alimento diminui consideravelmente nos estágios de pós-muda A e de pré-muda tardia D<sub>3</sub>, associada à elevação da frequência do comportamento parado. Esse fato poderia explicar as sobras periódicas de ração no manejo prático da ração em fazendas de cultivo. Por outro lado, a ingestão de alimento é restabelecida no estágio B do ciclo de muda, com elevadas frequências. Isso explica a prática de se aumentar a oferta de ração poucos dias após ter sobrado ração. Somado a isso, Almeida Neto e Freire (2007) relataram, em viveiro comercial de cultivo de camarões, uma duração média do ciclo da muda entre 10-13 dias.

Dado que os eventos associados aos estágios do ciclo de muda são cíclicos, nossos resultados indicam a previsibilidade das respostas comportamentais de *L. vannamei* em função dos estágios do ciclo de muda. Assim, sugerimos a incorporação do método de

observação dos estágios do ciclo de muda, através da setogênese, ao manejo prático dos viveiros de camarão. Dessa forma, as características comportamentais e fisiológicas de cada estágio do ciclo de muda dos camarões deveriam ser consideradas no manejo alimentar. Isso permitiria o ajuste da oferta em função do estágio da muda e conseqüentemente do comportamento dos animais, evitando o desperdício de ração.

Outro fato inerente aos viveiros de engorda de camarões marinhos é a colheita do camarão cultivado, chamado despesca, que em geral ocorre à noite. Antes desse momento, os carcinicultores realizam biometrias freqüentes e em dias consecutivos para programar o melhor dia para a despesca. Essas biometrias são realizadas durante o dia, normalmente pela manhã. Um dos principais critérios de avaliação é o percentual de camarões moles e amolecidos. A despesca só é efetivada quando o percentual de camarões moles e amolecidos é inferior a 5-10%. Contudo, é comum, no decorrer da despesca, os percentuais de camarões moles e amolecidos aumentarem bastante, depreciando o preço de venda dos camarões.

Nossos resultados mostram que o enterramento ocorre essencialmente na fase de claro, sobretudo nos estágios de pré-muda tardia  $D_2$  e  $D_3$ . Assim, será que os percentuais de camarões moles e amolecidos, revelados pelas biometrias feitas durante o dia, refletem a realidade do viveiro? Será que o aumento dos percentuais de camarões nesse estado, que ocorre no decorrer da despesca, é devido aos camarões que estavam enterrados durante o dia e se desenterraram à noite?

Em função disso, recomendamos a adoção de biometrias noturnas, principalmente quando seu objetivo for a programação da despesca do viveiro. Com a biometria noturna, provavelmente, o carcinicultor obterá informações que refletirão melhor a condição dos camarões do viveiro, visto que nessa fase do fotoperíodo a freqüência de enterramento dos camarões é quase nula.

## 5. Agradecimentos

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos; À fazenda de cultivo de camarões CAMANOR, por ceder os animais necessários a esse estudo; Ao Departamento de Fisiologia da UFRN e ao Departamento de Agropecuária da UFPB.

## 6. Referências Bibliográficas

- Almeida-Neto, M. E.; Freire, A. G. Avaliação de consumo alimentar e textura do exoesqueleto do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae) em cultivo comercial, durante o ciclo de muda. Boletim do Instituto de Pesca. V. 33 (2), p. 147-156. 2007.
- Barnabé, G. Muda. In: \_\_\_\_\_. Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura. España: Acribia, 1996. p. 237-249.
- Cesar, J. R. O; Zhao, B.; Malecha, S.; Ako, H.; Yang, J. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle. Aquaculture, v. 261, p. 688 – 694, 2006.
- Chan, S. M.; Rankin, S. M.; Keeley, L. L. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: Setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. Biological Bulletin, v. 175, p. 185-192, 1988.
- Chang, E. S. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 193, p. 1-14, 1995.
- Cheng, W.; Liu, C. H.; Yan, D. F.; Chen, J. C. Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stage. Aquaculture, v. 211, p. 325 – 339, 2002.

- Dall, W.; Hill, B. J.; Rothlisberg, P. C.; Staples, D. J. The Biology of the Penaeidae. In: Blaxter, J. H. S., Southward, A. J. (Editors). Advances in Marine Biology, v. 27. Academic Press, Cornwall, 1990.
- Dall, W. Feeding, digestion and assimilation in penaeidae. In: G. L. Allan and W. Dall (Editors), proceedings of the aquaculture nutrition workshop, Salamander Bay, Australia, p. 57-63, 1992.
- Gaxiola, G.; Cuzon, G.; Garcia, T.; Taboada, G.; Brito, R.; Chimal, M. E.; Paredes, A.; Soto, L.; Rosas, C.; Wormhoudt, A. V. Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moult cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *L. vannamei* (Boone, 1931). Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, v. 140, p. 29 – 39, 2005.
- Hindley, J. P. R. Effects of endogenous and some exogenous factors on the activity of juvenile banana prawn *Penaeus merguensis*. Marine Biology, v. 29, p. 1-8, 1975.
- Lima, P. P. Influência da oferta do alimento e da muda no comportamento alimentar do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Natal, 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Molina, C.; Llomitoa, E. C.; Orellana, F. Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. In: Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, V, 19-22 noviembre, 2000, Yucatán, México. Anais..., p. 358-380.
- Passano, L. M. Molting and its Control. In: Waterman. T. (Ed). The Physiology of Crustacea, v. I: Metabolism and Growth. Academic Press, p. 473-536, 1960.
- Penn, J. W. The behavior and catchability of some commercially exploited penaeids and their relationships to stock and recruitment. In Gulland, J. A.; Rothschild, B. J. (Eds). Penaeid

- shrimps: their biology and management. Farnham, England: Books Fishery New Books, 1984, p. 173-186.
- Pontes, C. S.; Arruda, M. F. Comportamento de *Litopenaeus vannamei* (Boone) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) em função da oferta do alimento artificial nas fases clara e escura do período de 24 horas. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, n. 3, p. 648 – 652, 2005.
- Pontes, C. S.; Arruda, M. F.; Menezes, A. A. L.; Lima, P. P. Daily activity pattern of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) juveniles under laboratory conditions. *Aquaculture research*, v. 37, p. 1001 – 1006, 2006.
- Pontes, C. S.; Lima, P. P.; Arruda, M. F. Feeding responses of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed at different frequencies under laboratory conditions. *Aquaculture research*, v. 39, p. 1416 – 1422, 2008.
- Robertson, L.; Bray, W.; Trujillo, J. L.; Lawrence, A. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *Journal of the world aquaculture society*, v. 18, n. 3, p. 180-185, 1987.
- Robertson, L.; Lawrence, A. L.; Castille, F. L. Effect of feeding frequency and feeding time on growth of *Penaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture and fisheries management*, v. 24, p. 1 – 6, 1993.
- Sánchez-Paz, A.; Garcia-Carreño, F.; Hernández-López, J.; Muhlia-Almazán, A.; Yepiz-Plascencia, G. Effect os short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 340, p. 184 – 193, 2007.
- Skinner, D. M. Molting and regeneration. In: Bliss, D. E. *The Biology of Crustacea*, v. 9: Integument, Pigments, and Hormonal Processes. Academic Press, p. 43-146, 1985.

Smith, D. M. and Dall, W. Moulting the tiger prawn *Penaeus esculentus*. In: Second Australian National Prawn Seminar. Rothlisberg, P. C.; Hill, B. J.; Staples, D. J. (Editors). Cleveland, Australia. p. 85-95, 1985.

**6. Experimento II – Avaliação da atividade de proteases digestivas do hepatopâncreas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, alimentados em diferentes horários, durante as fases de claro e de escuro.**

**Experimento III – Avaliação da alimentação baseada em horários de máxima ou mínima atividade de proteases digestivas sobre o padrão comportamental do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, nas fases de claro e de escuro.**

**6.1. Manuscrito 2 – Efeito dos diferentes horários de alimentação na atividade de protease digestiva não específica, específica (Tripsina) e padrão comportamental de juvenis do camarão marinho, *Litopenaeus vannamei* (CRUSTACEA:PENAEIDAE).**

**Marino Eugênio de Almeida Neto<sup>1</sup>, Maria de Fátima Arruda<sup>3</sup>, Ranielson de Souza Bezerra<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias, Bananeiras, PB, Brasil. <sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Departamento de Bioquímica, Recife, PE, Brasil. <sup>3</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Centro de Biociências, Natal, RN, Brasil.

Correspondência: Marino Eugênio de Almeida Neto, Laboratório de Aqüicultura, Departamento de Agropecuária do CCHSA/UFPB. Campus Universitário, s/n. CEP: 58220-000, Bananeiras, PB, Brasil, e-mail: marinoalmeida@yahoo.com.br

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de ração balanceada na alimentação dos camarões é feito através de tabelas para o cálculo da quantidade diária de ração, as quais se baseiam no consumo diário, peso médio dos camarões e na biomassa estimada do viveiro. Nesse modelo de alimentação não são considerados hábitos alimentares ou o estado fisiológico do camarão (Molina *et al.*, 2002). Assim, uma parte da ração ofertada ao camarão não é consumida ou é perdida na lixiviação, causando impactos ambientais. Além disso, a ração não consumida representa perda econômica para o produtor.

Para maximizar o aproveitamento da ração ofertada e, ao mesmo tempo, minimizar a descarga de nutrientes orgânicos nitrogenados no ecossistema, o entendimento da fisiologia digestiva é importante para investigações sobre a nutrição e ecologia alimentar dos camarões marinhos (Fernández-Gimenez *et al.*, 2001).

A digestão é um processo fisiológico que depende da combinação entre processos mecânicos, ativação molecular, reconhecimento e hidrólise do alimento em tempos e lugares específicos. Nesse processo, o hepatopâncreas é um órgão essencial, pois nele estão presentes as células responsáveis pela secreção de enzimas digestivas (células F, Fibrillenzellen) e células responsáveis pela absorção e estocagem de nutrientes (células R, Restzellen) (Passano, 1960; Dall e Moriarty, 1983; Ceccaldi, 1987; Dall, 1992; Ceccaldi, 1997).

Dentre as enzimas digestivas, destacam-se as proteases, carbohidrases e lipases. As proteases podem ser endopeptidases (tripsina e quimotripsina) ou exopeptidases (aminopeptidases, carboxipeptidases A e B e dipeptidases). Dentre as enzimas proteolíticas dos camarões, a tripsina é a mais importante por ser a responsável pela hidrólise de 50 a 60% da proteína consumida (Ceccaldi, 1987; Dall e Moriarty, 1983; Dall, 1992; Cruz-Suárez, 2000).

A atividade dessas enzimas é modulada por fatores externos, como parâmetros físico-químicos da água (pH, oxigênio, salinidade e temperatura) (Li *et al.*, 2008), idade e tamanho do camarão (Delgado *et al.*, 2003), ingredientes que compõem a dieta, nível e fonte de proteína, aglutinantes, aditivos alimentares (Cruz-Suárez, 2000), frequência alimentar e pela quantidade de alimento (Molina *et al.*, 2000). E fatores internos como mudanças morfológicas relacionadas à ontogenia, taxas metabólicas, ritmo circadiano, digestão e processos fisiológicos da muda (Dall, 1992; Lemos *et al.*, 2000; Muhlia-Almazán e García-Carreño, 2002).

Córdova-Murueta *et al.* (2004) afirmam que o estresse alimentar representado pela mudança repentina da composição da dieta (como mudança no teor protéico) pode influenciar a atividade da tripsina e quimotripsina em *L. vannamei*. Este trabalho reforça a conclusão do experimento de Muhlia-Almazán e García-Carreño (2002) que afirmam que o estresse alimentar, representado pela inanição, pode ser mais acentuado que o estresse fisiológico causado pelo ciclo da muda.

Variação na atividade enzimática também foi relatada por Molina *et al.* (2000) trabalhando com *L. vannamei* em condições controladas. Esses autores detectaram um pico máximo de atividade proteolítica às 14:00 horas e outro de menor intensidade às 02:00 horas, quando alimentados às 12:00 e 20:00 horas. Delgado *et al.* (2003) analisaram, em viveiro, a atividade das enzimas digestivas de acordo com o peso corpóreo (de 2 a 12 g), tendo evidenciado que a atividade da protease não específica diminuiu a partir de 6 g. O trabalho de Hernández e Murueta (2009) relata mudanças na atividade da tripsina em função de outros fatores, tais como, da expressão de isoenzimas, ontogenia e composição da dieta.

Por outro lado, o padrão comportamental de *L. vannamei* também pode ser influenciado por fatores internos e externos. Dentre os fatores internos, Almeida-Neto *et al.* (em preparação) relataram maior frequência do comportamento parado no estágio A do ciclo

de muda, enquanto os comportamentos exploração e ingestão de alimento foram mais freqüentes nos estágios B, C, D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub>. Esses mesmos autores concluíram que o comportamento de enterramento ocorre predominantemente no estágio D<sub>3</sub> e na fase de claro. Dentre os fatores externos, Pontes e Arruda (2005) relatam que o fotoperíodo influencia algumas categorias comportamentais. Registrando os comportamentos de natação e exploração, preponderantemente, na fase de escuro, enquanto o comportamento parado, na fase de claro.

Outros estudos relacionaram o comportamento de *L. vannamei* com a freqüência alimentar. Lima *et al.* (2009) avaliaram as respostas alimentares de camarões alimentados três, quatro ou sete vezes ao dia sob condições laboratoriais e demonstraram que a ingestão de alimento artificial foi mais freqüente nos tratamentos alimentados três vezes ao dia e menos freqüente naqueles alimentados sete vezes ao dia. Além disso, Pontes e Arruda (2005) observaram que a ingestão de alimento foi mais elevada na primeira meia hora após a oferta alimentar, principalmente nos horários da fase de claro.

Nesse contexto, o presente estudo objetiva, em um primeiro momento, quantificar a atividade de protease não específica e tripsina, em camarões alimentados em diferentes horários, de acordo com as fases de claro e de escuro. Para que no momento seguinte, avaliemos a influência do horário da oferta alimentar sobre o padrão comportamental de *L. vannamei*.

## **2. MÉTODOS**

O experimento foi realizado no Laboratório de Estudos do Comportamento de Camarões, Departamento de Fisiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. As análises enzimáticas foram realizadas no Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

Neste estudo foram utilizados camarões juvenis da espécie *Litopenaeus vannamei* coletados em viveiro comercial da empresa Camarões do Nordeste Ltda. (CAMANOR), situada no município de Canguaretama estado do Rio Grande do Norte, apresentando peso médio 5,250 g ( $\pm$  0,250 g, desvio padrão). Na fase 1, avaliação do efeito dos diferentes horários de alimentação sobre a atividade proteolítica no hepatopâncreas dos camarões, os animais foram estocados em aquários com dimensões de 100 cm (comprimento) x 50 cm (largura) x 60 cm (altura). Na fase 2, avaliação do horário de alimentação sobre o padrão comportamental dos camarões, os animais foram estocados em aquários com dimensões de 50 cm (comprimento) x 30 cm (largura) x 40 cm (altura). Os aquário apresentavam o fundo recoberto por placas biológicas, uma camada de lã de fibra de vidro e 5 cm de areia da praia. O oxigênio foi suprido por um sistema de tubos ligados a um soprador radial de ¼ cv, que oxigenava a água através de pedras porosas.

Acima de cada aquário foi instalado um biofiltro. Nos aquários da fase 1, estes tinham dimensões de 50 cm (comprimento) x 25 cm (largura) x 15 cm (altura); nos aquários da fase 2, estes tinham dimensões de 28 cm (comprimento) x 15 cm (largura) x 15 cm (altura). Em ambos os casos, os biofiltros eram compostos por camadas de concha de ostra quebrada, areia grossa, areia fina e lã de fibra de vidro. Bombas submersas de sucção proviam a recirculação de água entre aquário e biofiltro, com vazão de 500 L.h<sup>-1</sup>, para os aquários da fase 1, e vazão de 160 L.h<sup>-1</sup> para os aquários da fase 2.

A qualidade da água foi monitorada diariamente para oxigênio dissolvido, pH, temperatura e salinidade, sendo mantidos sempre nas seguintes faixas: > 5,0 mg.L<sup>-1</sup>; 7,6 – 8,2; 25,0 – 27,0 °C e 30 – 32 ups, respectivamente. A amônia tóxica foi monitorada semanalmente através do kit para análise de amônia tóxica em aquários de água salgada da ALCON Ltda, não sendo detectada após a semana de aclimação. Trocas d'água foram realizadas três vezes por semana, a uma taxa de 20 % do volume total de cada aquário, sempre após as coletas de

dados. Os aquários foram mantidos com iluminação artificial e sob fotoperíodo 12:12 horas (claro:escuro), tendo a fase de claro iniciado às 6 horas e a fase de escuro iniciado às 18 horas. Os aquários foram divididos em dois ambientes anexos, separados por uma parede, de modo que o primeiro tinha seu fotoperíodo artificial sincronizado com o fotoperíodo natural, enquanto o outro tinha o fotoperíodo artificialmente invertido. Desse modo, foi possível observar ambas as fases do fotoperíodo na mesma sessão de trabalho.

## 2.1 Fase 1

Para realização dessa fase foram conduzidos 12 tratamentos alimentares na fase de claro (1 para cada hora dessa fase) e 12 tratamentos alimentares, equivalentes, na fase de escuro, com três repetições cada, inicialmente estocados com 15 camarões. Essa fase foi dividida em 9 etapas, sendo realizados em cada uma delas, simultaneamente, 4 tratamentos no claro e 4 no escuro. Essa rotina experimental ocorreu, consecutivamente, até a conclusão das 3 repetições de cada um dos 12 tratamentos tanto na fase de claro quanto na de escuro.

Cada tratamento alimentar consistiu de apenas uma oferta de ração diária, seguindo o número de horas de cada fase do fotoperíodo. Por exemplo, no tratamento T1 da fase de claro os camarões foram alimentados apenas na primeira hora dessa fase. No tratamento T3 da fase de escuro os camarões foram alimentados apenas na terceira hora dessa fase (Tabela 1). Para efeito de comparação, foi conduzido um tratamento controle para cada fase do fotoperíodo. Nesse tratamento, os camarões foram alimentados 3 vezes ao dia (nos 3º, 7º e 11º horários de sua respectiva fase do fotoperíodo).

Tabela 1. Tratamentos alimentares aplicados nas fases de claro e de escuro. No tratamento T1, os camarões foram alimentados apenas na 1º hora da respectiva fase. Assim sucessivamente, até o tratamento T12, quando os camarões foram alimentados apenas na 12º hora da respectiva fase.

| Tratamento Alimentar        |        | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 | T10 | T11 | T12 |
|-----------------------------|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| Horário de oferta alimentar | Claro  | 1º | 2º | 3º | 4º | 5º | 6º | 7º | 8º | 9º | 10º | 11º | 12º |
|                             | Escuro | 1º | 2º | 3º | 4º | 5º | 6º | 7º | 8º | 9º | 10º | 11º | 12º |

Os animais, nos diferentes tratamentos alimentares, inclusive no controle, foram alimentados com ração comercial contendo 35 % de proteína bruta, a uma taxa de 20 % da biomassa viva ao dia. Nos aquários submetidos ao tratamento alimentar essa quantidade de ração foi ofertada de uma vez, enquanto no tratamento controle, os mesmos 20 % da biomassa foram fracionados em 3 ofertas. Porém, em ambos os casos, uma hora após a oferta alimentar os restos alimentares foram retirados.

Após a estocagem houve um período de aclimação de 8 dias, sendo alimentados de acordo com o respectivo tratamento. Foram então mantidos no tratamento por mais 21 dias para que houvesse adaptação fisiológica ao regime alimentar (Pascual *et al.*, 2006). No 28º dia de experimento, os camarões foram sacrificados por choque térmico, em seguida, pesados. Pouco depois, os camarões foram dissecados para remoção do hepatopâncreas, que foram então pesados, identificados e armazenados a -25 °C, para posterior análise da atividade enzimática (Delgado *et al.* 2003).

Antes da análise de protease não específica e protease específica (tripsina), preparou-se o extrato enzimático bruto. Para a preparação desse extrato, o hepatopâncreas foi homogeneizado em solução tampão Tris-HCl pH 8,0 0,01M, com 0,15M de NaCl, a uma proporção de 1/25 (peso/volume). Desta solução, 2 ml foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos; em seguida 1,5 ml do sobrenadante foi transferido para microtubos e armazenados a -20 °C.

Para determinação da atividade de protease não específica, foi usado o método de Bezerra *et al.* (2005). Em 50µl de azocaseína a 1% (peso/volume), colocou-se 30µl de extrato diluído (extrato bruto diluído 8x em solução tampão Tris-HCl pH 8,0 0,01M, com 0,15M de NaCl), aguardando tempo de reação de 60 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de reação, adicionou-se 240µl de ácido tri-cloroacético (TCA) a 10% e aguardou-se mais 15 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 8.000 rpm por 5 minutos. Finalmente, 70µl

do sobrenadante foram retirados e colocados em microplaca de leitura de ELISA com mais 130µl de NaOH 1M. A leitura foi feita a 450nm de absorbância.

O cálculo da atividade de protease não específica segue a fórmula abaixo, expressada em unidade de atividade enzimática (U). Essa unidade é definida como a quantidade de enzima capaz de produzir variação de 0,001 nm na absorbância, por minuto.

$$E = \frac{((A/V*T) * 1000) * D}{P}$$

E = Atividade de protease não específica; A = Absorbância obtida em ELISA; V = Volume da solução contida no poço da microplaca, em mililitros; T = Tempo de reação em minutos; D = Fator de diluição da enzima; P = Dosagem de proteína total do extrato enzimático.

Para determinação da atividade de tripsina, foi usado o método de Alencar *et al.*(2003): Nessa análise, as soluções foram acondicionadas em colocados microplaca, na seqüência: 140 µl de tampão Tris-HCl pH 8,0 0,1M; 30 µl do extrato diluído (extrato bruto diluído 25x em solução tampão Tris-HCl pH 8,0 0,01M, com 0,15M de NaCl) e 30 µl de benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a 8 mM. Em seguida, as absorbâncias a 405nm foram monitoradas no tempo 0min e 20min, a diferença de absorbâncias entre esses dois momentos que foi utilizada no cálculo da atividade de tripsina.

O cálculo da atividade de protease específica tripsina segue a fórmula abaixo, expressada em unidade de atividade enzimática (U) ou mU (U\*1000). Essa unidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de para-nitroanilina, por minuto.

$$E = \frac{(((A/T)*1000*V)*D)*1000}{C*P}$$

E = Atividade de protease específica (tripsina); A = Diferença entre as absorbâncias no tempo 0min e 20min obtida em ELISA; T = Tempo de reação em minutos; V = Volume da solução contida no poço da microplaca, em mililitros; C = Coeficiente de extinção do substrato; P = Dosagem de proteína total do extrato enzimático; D = Fator de diluição da enzima.

## 2.2 Fase 2

Nessa fase, foi avaliado o padrão comportamental em dois horários da fase de claro e dois horários da fase de escuro. Esses horários foram selecionados de acordo com a resposta máxima e mínima da atividade de proteases digestivas, de cada fase do fotoperíodo. Para isso, foram consideradas os horários de resposta máxima e mínima da atividade de proteases digestivas para *L. vannamei* encontradas na fase 1.

Em função disso, foram conduzidos 2 tratamentos alimentares na fase de claro, um alimentado apenas na 6<sup>o</sup> hora após o início dessa fase (resposta mínima na atividade de proteases digestivas – T<sub>mín</sub>-claro) e outro alimentado apenas na 10<sup>o</sup> hora após o início dessa fase (resposta máxima na atividade de proteases digestivas – T<sub>máx</sub>-claro). Na fase de escuro, foram conduzidos outros 2 tratamentos alimentares, um alimentado apenas na 3<sup>o</sup> hora após o início dessa fase (resposta mínima na atividade de proteases digestivas – T<sub>mín</sub>-escuro) e outro alimentado apenas na 12<sup>o</sup> hora após início dessa fase (resposta máxima na atividade de proteases digestivas – T<sub>máx</sub>-escuro). Cada tratamento foi repetido quatro vezes, inicialmente estocados com 5 camarões por tratamento. Os camarões foram marcados com anéis de silicone nos pedúnculos oculares direito ou esquerdo nas cores azul ou rosa, restando um camarão não marcado em cada aquário.

Os animais, nos diferentes tratamentos alimentares foram alimentados com ração comercial contendo 35 % de proteína bruta, a uma taxa de 20 % da biomassa viva ao dia. Essa

quantidade de ração foi ofertada de uma vez, no respectivo horário experimental, sendo os restos alimentares retirados uma hora após a oferta alimentar.

Após a estocagem houve um período de aclimação de 8 dias, sendo alimentados de acordo com o respectivo tratamento. Após a aclimação, os camarões foram mantidos sob o regime experimental por mais 21 dias para que ocorresse adaptação fisiológica do hepatopâncreas ao regime alimentar submetido. A partir do 28º dia de experimento, e durante um período de 12 dias, os indivíduos foram observados em janelas de 30 minutos, sendo 15 minutos antes e 15 minutos depois da oferta de ração comercial, pelo método focal instantâneo com registro a cada 60 segundos. Durante as sessões de observação, o observador movia-se apenas para registrar o comportamento após os 60 segundos. Além disso, o laboratório mantinha-se fechado para evitar interferências no comportamento do animal.

As categorias comportamentais observadas foram as descritas por Pontes *et al.* (2006): Ingestão de alimento – animal introduzindo ração artificial ou restos de exuvia na cavidade bucal; Exploração – introdução e retirada contínua dos pereiópodos quelados, no substrato, podendo eventualmente levar a boca; Rastejamento – o animal desloca-se sobre o substrato, utilizando seus pereiópodos; Natação – o animal desloca-se horizontalmente ou verticalmente, ou ainda em suspensão na coluna d'água, através do movimento dos pleópodos; Parado – estático, sem movimento nos apêndices locomotores; Enterramento – o animal está com pelo menos a metade do seu corpo totalmente enterrada.

### **2.3 Análise estatística**

As variáveis protease não específica, tripsina e as categorias comportamentais foram consideradas dependentes e fases do fotoperíodo como variável independente. Dentro de cada fase do fotoperíodo, o horário de alimentação também foi considerada independente.

Antes de analisar o efeito das fases do fotoperíodo sobre as variáveis dependentes aplicou-se o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Os dados da tripsina foram aderentes à distribuição normal, enquanto, os dados de protease não específica e os dados comportamentais não aderiram à distribuição normal, ou seja, considerados dados não-paramétricos. Em função disso, foi aplicado o teste *t* na avaliação do efeito das fases do fotoperíodo sobre a atividade de tripsina, e na avaliação desse efeito sobre a protease não específica e frequência das categorias comportamentais, foi aplicado o teste U de Mann-Whitney.

Em cada fase do fotoperíodo, foi avaliada a influência do horário de alimentação sobre a atividade de protease não específica e tripsina. Nesse momento, com as amostras separadas por fase do fotoperíodo, e conseqüentemente, com a população amostral diminuída, aplicou-se novamente o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Na fase de claro, os dados de ambas as variáveis dependentes aderiram à distribuição normal, enquanto na fase de escuro apenas os dados da tripsina aderiram a essa distribuição. Em função disso, utilizou-se a análise de variância ANOVA para avaliar o efeito do tratamento alimentar na atividade de tripsina em ambas as fases, bem como, para avaliar esse efeito na protease não específica na fase de claro. O teste de Tuckey foi usado como teste de comparação múltipla nos casos em que houve homogeneidade de variâncias e o teste de Tamhane usado nos casos em que não houve. Para avaliação do efeito do tratamento alimentar na protease não específica, da fase de escuro, aplicou-se o teste H de Krukall-Wallis e o teste U de Mann-Whitney para comparações dos tratamentos dois a dois, pois nesse caso, essas variáveis foram consideradas não-paramétricas.

Em cada fase do fotoperíodo, foi avaliada a influência dos tratamentos alimentares sobre as categorias comportamentais, sendo usado o teste não paramétrico U de Mann-Whitney.

Para elaboração dos gráficos, os resultados foram convertidos em média e erro padrão da média. O nível de significância adotado nos testes estatísticos foi  $\leq 5\%$ .

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Fase 1**

No tratamento controle da fase de claro foram coletados 32 hepatopâncreas, enquanto no controle da fase de escuro foram coletados 29. Quanto ao tratamento alimentar, foram coletados 393 hepatopâncreas na fase de claro e 402 na fase de escuro. Com 34 hepatopâncreas coletados em T1, 31 (T2), 32 (T3), 31 (T4), 32 (T5), 34(T6), 34 (T7), 33 (T8), 32 (T9), 34 (T10), 32 (T11) e 34 (T12) na fase de claro e 34 hepatopâncreas coletados em T1, 32 (T2), 33 (T3), 32 (T4), 32 (T5), 35 (T6), 34 (T7), 30 (T8), 36 (T9), 33 (T10), 35 (T11) e 36 (T12) na fase de escuro.

##### **3.1.1 Atividade da Tripsina**

Na fase de claro, a ANOVA mostrou haver diferenças significativas na atividade da tripsina entre os tratamentos alimentares (GL = 12; F = 4,326;  $p \leq 0,000$ ). A partir do teste de Tuckey, foi identificado que a maior atividade de tripsina, encontrada no tratamento T10, foi significativamente diferente da encontrada nos tratamentos T3, T4 e T6. O mesmo teste também revelou que a menor atividade de tripsina, encontrada no tratamento T3, foi estatisticamente diferente apenas do encontrado no tratamento T10 (Anexo 3, Tabela 10) (Figura 1). Os valores encontrados no controle foram significativamente superiores aos encontrados na maioria dos demais tratamentos, exceto T1, T9, T10, T11 e T12.

Entre os tratamentos alimentares da fase de escuro, a ANOVA mostrou haver diferenças significativas na atividade da tripsina (GL = 12; F = 5,975;  $p \leq 0,000$ ). Após o teste

de Tamhane, foi identificado que a maior atividade de tripsina, encontrada no tratamento T12, foi diferente da atividade encontrada em T2, T3 e T4. O mesmo teste também revelou que a menor atividade de tripsina, encontrada no tratamento T3, foi significativamente diferente da encontrada em T10, T11 e T12 (Anexo 3, Tabela 10) (Figura 1). Os valores encontrados no controle foram significativamente superiores aos encontrados nos tratamentos T2, T3, T4, T5, T7 e T9.

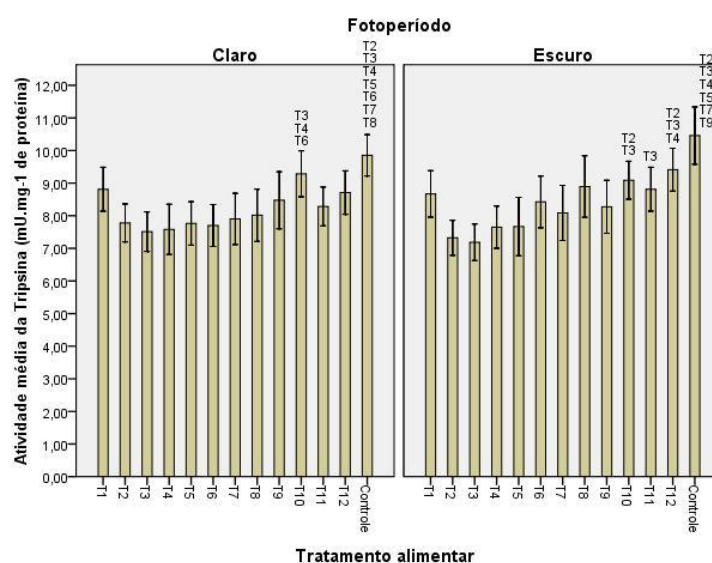


Figura 1. Atividade média de protease específica tripsina de *L. vannamei*, expresso em mU.mg<sup>-1</sup> de proteína  $\pm$  intervalo de confiança de 95 %, de acordo com os tratamentos alimentares e tratamento controle, nas fases de claro e de escuro. Os tratamentos inscritos acima de cada barra representam aqueles em que houve diferença estatística.

### 3.1.2 Atividade da Protease não específica

Na fase de claro, a ANOVA mostrou haver diferenças significativas na atividade da protease não específica (GL = 12; F = 4,609;  $p \leq 0,000$ ). A partir do teste Tamhane, foi identificado que a maior atividade de protease não específica, encontrada no tratamento T1, foi significativamente diferente da atividade encontrada em T6 e T7. O mesmo teste também revelou que a menor atividade dessa protease, encontrada no tratamento T7, foi diferente da encontrada em T1, T10, T11 e tratamento controle (Anexo 3, Tabela 11) (Figura 2). Os

valores encontrados no controle foram significativamente superiores aos encontrados em T3, T6 e T7.

Considerando os tratamentos alimentares da fase de escuro, a atividade da protease não específica variou significativamente em função dos tratamentos alimentares (teste H de Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 40,938$ ; GL = 12;  $p \leq 0,000$ ). Com base no teste U de Mann-Whitney, foram identificadas diferenças estatísticas entre o tratamento de maior concentração de protease não específica, T12, com o T2, T3, T4, T5, T7 e T11. Também se registrou diferenças estatísticas entre o T3, de menor atividade de protease não específica, com os tratamentos T1, T10 e T11. Os valores encontrados no controle foram significativamente superiores aos encontrados na maioria dos demais tratamentos, exceto T6 e T9 (Anexo 3, Tabela 12).

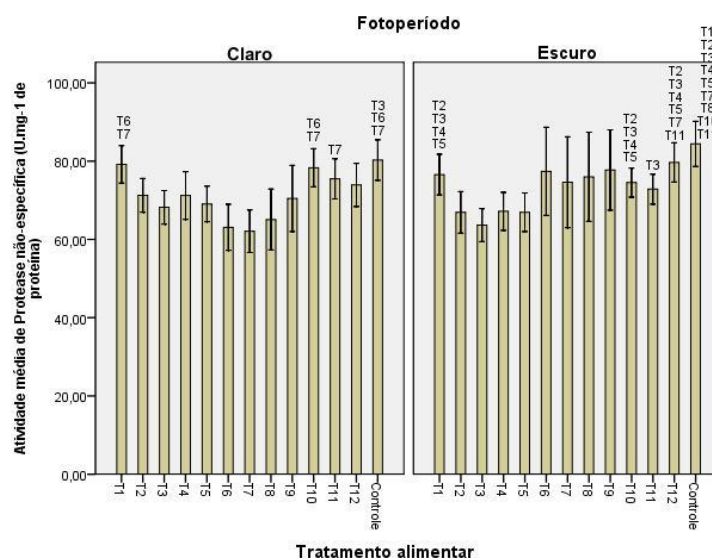


Figura 2. Atividade média de protease não específica de *L. vannamei*, expresso em U.mg<sup>-1</sup> de proteína  $\pm$  intervalo de confiança de 95 %, de acordo com os tratamentos alimentares e tratamento controle, nas fases de claro e de escuro. Os tratamentos inscritos acima de cada barra representam aqueles em que houve diferença estatística.

### 3.2 Fase 2

Na fase de claro do fotoperíodo, foram observados 40 camarões, sendo 20 sob tratamento alimentar baseado na mínima atividade proteolítica dessa fase (T<sub>mín-claro</sub>) e 20

sob tratamento alimentar baseado na máxima atividade proteolítica (Tmáx-claro). Na fase de escuro, foram observados 37 camarões, sendo 18 sob tratamento alimentar baseado na mínima atividade proteolítica dessa fase (Tmín-escuro) e 19 sob tratamento alimentar baseado na máxima atividade proteolítica (Tmáx-escuro).

### 3.2.1 Padrão comportamental de acordo com os tratamentos da fase de claro

Na fase de claro, os comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento foram registrados em ambos os tratamentos. Em Tmáx-claro, ingestão de alimento e exploração foram os comportamentos mais frequentes, alcançando 40,28 % e 23,58 % dos registros, respectivamente. Em Tmín-claro, essa ordem se inverteu, com exploração representando 31,23 % dos registros e ingestão de alimento 30,91 % dos registros. Em ambos os tratamentos, por ordem decrescente de frequência de registros, seguem-se parado, natação, enterramento e rastejamento (Figura 3).

Comparando a frequência de registros dos comportamentos entre Tmáx-claro e Tmín-claro, o teste U de Mann-Whitney revelou diferenças estatísticas. Os comportamentos ingestão de alimento e rastejamento foram mais frequentes no Tmáx-claro, enquanto exploração e enterramento foram mais frequentes em Tmín-claro (Anexo 4, Tabela 13).

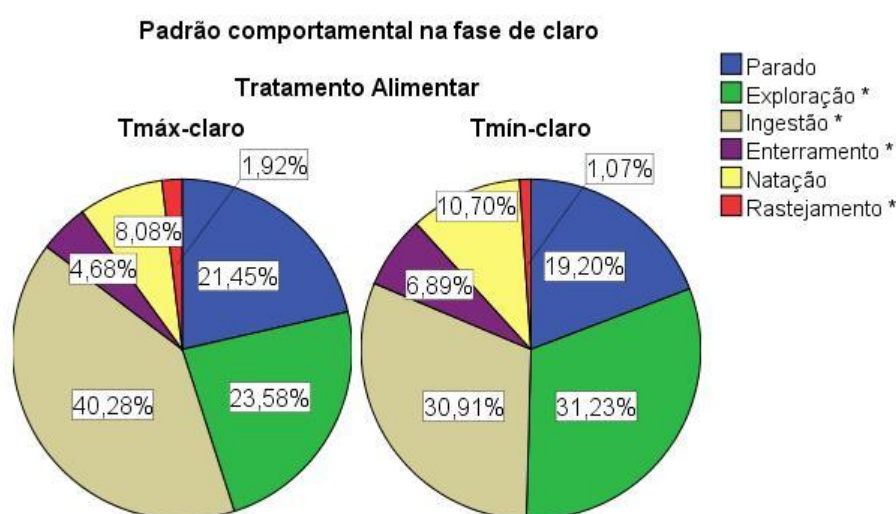


Figura 3. Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com o tratamento alimentar Tmáx-claro (tratamento baseado na máxima atividade proteolítica da fase de claro) e Tmín-claro (tratamento baseado na mínima atividade proteolítica da fase de claro). O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significativa no comportamento entre as fases do fotoperíodo.

### 3.2.2 Padrão comportamental de acordo com os tratamentos da fase de escuro

Na fase de escuro do fotoperíodo, todos os comportamentos foram registrados em ambos os tratamentos, exceto o comportamento enterramento no tratamento Tmín-escuro. O comportamento ingestão de alimento continuou sendo o mais freqüente, alcançando 35,02 % dos registros no Tmáx-escuro e 33,48 % dos registros no Tmín-escuro. Porém, a distribuição dos demais comportamentos não ocorreu de modo semelhante ao encontrado na fase de claro. No tratamento Tmáx-escuro, por ordem decrescente de freqüência de registros, seguem-se exploração, natação, parado, rastejamento e enterramento. Enquanto no tratamento Tmín-escuro, também por ordem decrescente de freqüência de registros, seguem-se exploração, parado, natação e rastejamento (Figura 4).

O teste U de Mann-Whitney revelou diferença estatística apenas na freqüência de registros do comportamento parado de acordo com o tratamento alimentar, sendo mais freqüente no tratamento Tmín-escuro (Anexo 4, Tabela 14).

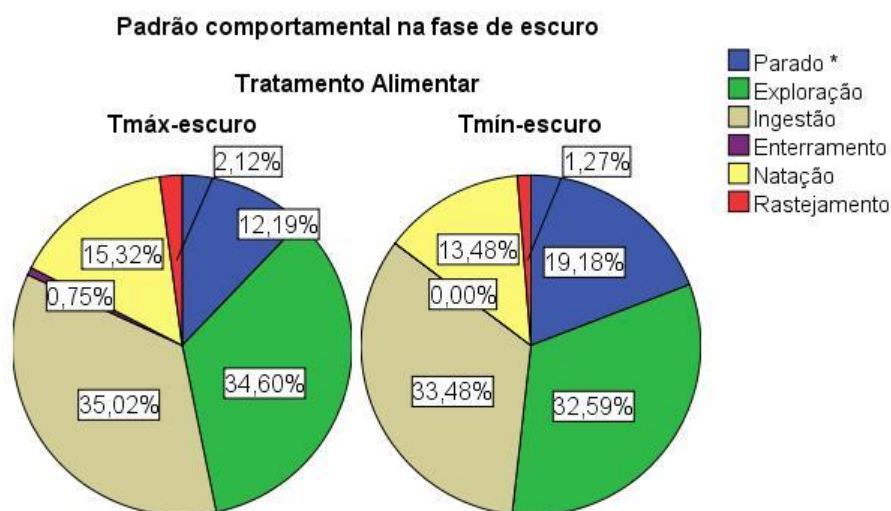


Figura 4. Percentual de ocorrência das categorias comportamentais de *L. vannamei*, de acordo com o tratamento alimentar Tmáx-escuro (tratamento baseado na máxima atividade proteolítica da fase de escuro) e Tmín-escuro (tratamento baseado na mínima atividade proteolítica da fase de escuro). O asterisco ao lado da legenda indica a diferença estatisticamente significativa no comportamento entre as fases do fotoperíodo.

#### 4. Discussão

No estudo das proteases digestivas de peneídeos, nossos resultados foram corroborados por Muhlia-Almazán e Garcia-Carreño (2002) que avaliaram a influencia do ciclo de muda e inanição na síntese de enzimas proteolíticas. Encontrando atividade de tripsina entre 5 e 14 unidades enzimáticas. Buarque *et al.* (2010), estudaram as proteases digestivas e peptidases no hepatopâncreas de *Farfantepenaeus subtilis* em dois estágios subadultos, e encontraram atividade média de tripsina de 6,82 mU.mg<sup>-1</sup> de proteína, em camarões com 6 g de peso médio. Em *Farfantepenaeus paulensis*, Buarque *et al.* (2009) estudaram proteases digestivas e peptidases no hepatopâncreas. Encontraram atividade média de tripsina de 5,13 mU.mg<sup>-1</sup> de proteína em camarões de 6 – 10 g. Lee *et al.* (1984), descreveram a relação entre atividade de proteases digestivas , dieta e tamanho de *L. vannamei*. Encontraram uma variação na atividade de protease não específica de 29,8 – 149,3 unidades enzimáticas (U) em camarões de 4 g, de 79,3 – 127,1 U em camarões de 10 g e 106,3 – 156,4 em camarões de 20 g, dependendo da dieta aplicada.

Nossos resultados mostram ampla variação da atividade enzimática entre valores mínimos e máximos de cada tratamento, podendo ser devido fatores endógenos, como o ciclo de muda. Certamente, coletamos animais nos diferentes estágios do ciclo de muda e em diferentes momentos fisiológicos. Muhlia-Almazán e Garcia-Carreño (2002) relatam que camarões em estágio de pós-muda e sem alimentação por 24 horas, tem sua atividade de tripsina reduzida em até 54 %, quando comparado com camarões em estágio de pré-muda recente na mesma condição. Cordova-Murueta *et al.* (2004) avaliando o efeito do estresse alimentar (substituição de ração com 45 % de PB por ração com 35 % de PB) e de estressor físico (manipulação física repetidamente) sobre enzimas digestivas de *L. vannamei*, encontraram uma redução de aproximadamente 32 % na atividade de tripsina de animais que sofreram estresse alimentar e redução ainda maior em animais que sofreram estresse físico.

Outro fator a se considerar é a adaptação enzimática, processo de ajuste da atividade enzimática digestiva quando o organismo é exposto a estresses alimentares prolongados, tais como comida inadequada, fatores anti-nutricionais e contenção de alimento (Le Moullac *et al.*, 1996). No entanto, Hernández e Murueta (2009) afirmam que, durante a ontogenia, a atividade da tripsina em *L. vannamei* não é associada apenas a dieta, parece estar sob controle genético.

A adaptação dos animais também pode se dá em nível comportamental. Nossos resultados mostraram que os comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento, expressados por *L. vannamei*, variaram em função do horário da oferta alimentar.

Na fase de claro, os comportamentos ingestão de alimento e rastejamento foram estatisticamente mais freqüentes nos camarões alimentados no horário de maior resposta da atividade de enzimas digestivas proteolíticas (T<sub>máx</sub>-claro), enquanto exploração e enterramento mais freqüentes nos camarões do T<sub>mín</sub>-claro. Entre os tratamentos da fase de escuro, apenas o comportamento parado variou significativamente, sendo mais freqüente no T<sub>mín</sub>-escuro, indicando que o horário de oferta alimentar influencia a busca e ingestão de alimento, em camarões alimentados na fase de claro. Na fase de escuro, essa influência é reduzida.

A influência exercida pelo horário de oferta alimentar sobre a freqüência dos comportamentos de ingestão de alimento deve ser resultado da adaptação do camarão a condição experimental. Nesse sentido, vários estudos foram desenvolvidos objetivando avaliar a resposta fisiológica dos camarões a diversas situações. Lee *et al.* (1984) descreveram a relação entre atividade enzimática, tamanho e dieta de *L. vannamei*, testando 5 dietas, com diferentes teores de proteína, em camarões 4, 10 e 20 g. Concluíram que o tamanho do camarão, a fonte e nível de proteína da dieta afetaram em algum grau a atividade proteolítica

em *L. vannamei*. Reforçando esses resultados, Delgado *et al.* (2003) estudaram a atividade de enzimas digestivas em função do conteúdo estomacal de juvenis de *L. vannamei*, e sugerem que a atividade enzimática se adapta a dietas com menor conteúdo protéico, diminuindo a atividade de proteases e elevando a de carboidrases, de acordo com o crescimento do camarão e seu conteúdo estomacal. Outros processos de resposta fisiológica às condições adversas são relatados, tais como uma maior atividade de tripsina em salinidades mais baixas, para compensar o gasto energético (Li *et al.* 2008) e diminuição na síntese de enzimas digestivas em situações de inanição, com diminuição da concentração de glicose e glicogênio no hepatopâncreas (Sánchez-Paz *et al.* 2007).

Outras condições favorecem a fisiologia do camarão, refletindo na melhora do seu desempenho. Wang (2007), avaliando três concentrações crescentes de probióticos misturados a ração comercial e o tratamento controle (sem probiótico) sobre a atividade de enzimas digestivas de *L. vannamei*, relata um aumento, na atividade de enzimas digestivas, proporcional a concentração do probiótico. Molina *et al.* (2000) alimentaram *L. vannamei* 2 vezes ao dia em diferentes horários de alimentação (8:00 e 16:00, 10:00 e 18:00, 12:00 e 20:00 ou 14:00 e 22:00 horas). Eles encontraram que os camarões alimentados as 12:00 ou 14:00 horas consumiram mais ração e tiveram maior biomassa final.

A elevada frequência de ingestão de alimento, principalmente nos horários de melhor resposta da atividade enzimática, também pode ser resultado do processo adaptativo. Segundo Re *et al.* (2006), a busca pela adaptação pode se refletir na expressão comportamental. Em experimento laboratorial, os autores testaram o efeito de diferentes combinações de salinidade e temperatura sobre a “temperatura preferida” pelo *Litopenaeus stylirostris*, definido por eles como comportamento termorregulatório. Para tanto, com o auxílio de um aquecedor, criaram um gradiente termal com variação estável e linear de 10,0 – 33 °C, e evidenciaram que o deslocamento do animal revelou uma temperatura preferida entre 26 – 28,4 °C, independente

da salinidade. Lima *et al.* (2009) avaliaram as respostas alimentares de *L. vannamei* em 3 frequências alimentares (3, 4 ou 7 vezes ao dia), encontrando que a frequência de ingestão de alimento é inversamente proporcional a quantidade de ofertas alimentares, sendo mais freqüente em camarões alimentados 3 vezes ao dia e menos freqüente em camarões alimentados 7 vezes ao dia.

Os comportamentos exploração, parado, natação e rastejamento variaram em função do horário de oferta alimentar, porém de forma diferente quando consideramos as fases do fotoperíodo. Em camarões alimentados no horário de mínima atividade de enzimas digestivas proteolíticas, houve diferença significativa apenas nos comportamentos natação (mais freqüente na fase de escuro) e enterramento (mais freqüente na fase de claro). Em camarões alimentados no horário de máxima atividade, houve diferença significativa no comportamento exploração, natação (mais freqüentes na fase de escuro), parado e enterramento (mais freqüentes na fase de claro). Ficou evidente que comportamentos de maior atividade, como natação e exploração, ocorrem preferencialmente na fase de escuro, enquanto comportamento de menor atividade, como parado e enterramento, ocorrem preferencialmente na fase de claro.

Corroborando nossos resultados sobre a natação e exploração, Pontes e Arruda (2005) estudando o comportamento de *L. vannamei* em função da oferta alimentar nas fases de claro e escuro, afirmam que os camarões nadam em ambas as fases, porém com maior frequência na fase de escuro. Pontes *et al.* (2006), descrevendo o padrão de atividade diária de juvenis de *L. vannamei* em condições laboratoriais, relatam que a natação ocorre predominantemente na fase de escuro. Hindley (1975) investigou os efeitos do fotoperíodo na atividade locomotora do *Fenneropenaeus merguensis*, encontrando que a atividade locomotora foi maior na fase de escuro, mas não restrita a ela.

Do ponto de vista comportamental, recentes estudos reforçam a idéia de uma alimentação fracionada em 3 ofertas (Lima *et al.*, 2009). Nesse contexto, nossos resultados indicam que a busca e ingestão de alimento é intensificada quando a ração é ofertada em horários de melhor resposta da atividade de enzimas digestivas proteolíticas.

Do ponto de vista fisiológico, podemos registrar que, em condições laboratoriais, os horários de maior atividade de enzimas digestivas proteolíticas se concentraram entre a 9<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> horas após início da fase de claro, além da 1<sup>o</sup> hora dessa fase. Enquanto os horários de menor atividade de enzimas digestivas proteolíticas se concentraram entre a 2<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> horas após início da fase de claro. Na fase de escuro, a atividade de enzimas proteolíticas se manteve elevada na maior parte dessa fase. Nesse sentido, nossos resultados sugerem que a oferta de ração deva ser fracionada de modo a ofertar a maior parte em momentos de maior atividade enzimática e a menor parte nos momentos de menor atividade.

Em conclusão, recomendamos que a ração seja ofertada principalmente nos horários da tarde, pois os camarões apresentariam uma melhor resposta enzimática e, conseqüentemente, maior resposta comportamental de exploração e ingestão de alimento. Desse modo a ração seria prontamente ingerida, e melhor digerida, minimizando as perdas por lixiviação, maximizando assim os ganhos nutricionais. Sabendo que a frequência dos comportamentos de exploração e ingestão de alimento é alta na fase de escuro, sugerimos também a oferta de ração à noite, desde que ressalvada a concentração de oxigênio dissolvido e a qualidade da água de cultivo.

## **5. Agradecimentos**

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos; À fazenda de cultivo de camarões CAMANOR, por ceder os animais necessários a esse estudo; Ao Departamento de Fisiologia da UFRN; Ao Departamento de Agropecuária da UFPB e ao Laboratório de enzimologia – LABENZ da UFPE.

## 6. Referências Bibliográficas

- Alencar, R. B.; Biondi, M. M.; Paiva, P. M. G.; Vieira, V. L. A.; Carvalho, L. B., Jr.; Bezerra, R. S. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 6 (2), p. 279 – 284, 2003.
- Almeida-Neto, M. E.; Silva, P. F.; Arruda, M. F. Padrão comportamental do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae), de acordo com os estágios do ciclo de muda e fases do fotoperíodo. (em preparação).
- Bezerra, R. S.; Lins, E. J. F.; Alencar, R. B.; Paiva, P. M. G.; Chaves, M. E. C.; Coelho, L. C. B. B.; Carvalho, L. B., Jr. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1829 – 1834, 2005.
- Buarque, D. S.; Castro, P. F.; Santos, F. M. S.; Lemos, D.; Carvalho Jr., L. B.; Bezerra, R. S. Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture Research*, v. 40, p. 861 – 870, 2009.
- Buarque, D. S.; Castro, P. F.; Santos, F. M. S.; Amaral, I. P. G.; Oliveira, S. M.; Alves, K. B.; Carvalho Jr., L. B.; Bezerra, R. S. Digestive proteinases and peptidases in the hepatopancreas of the southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) in two sub-adult stages. *Aquaculture Nutrition*, v. 16, p. 359 – 369, 2010.
- Ceccaldi, H. La digestión en los crustáceos. In: Monteros, J. E. de los; Labarta, U. *Nutrición en acuicultura*, v. 1. España: Industrias Gráficas, 1987. p. 67-84.
- Ceccaldi, H. Anatomy and Physiology of the digestive system. In: D'Abramo, L. R., Conklin, D. E. & Akiyama, D. M. (Eds.). *Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture*, V. 6, p. 261 – 291. Baton Rouge: World Aquaculture Society. 1997.

- Córdova-Murueta, J. H.; Garcia-Carreño, F. L.; Navarret-del-Toro, M. L. A. Effect of stressors on shrimp digestive enzymes from assays of feces: an alternate method of evaluation. *Aquaculture*, v. 233, p. 439 – 449, 2004.
- Cruz-Suárez, L. E. Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. In: Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, V, 19-22 noviembre, 2000, Yucatán, México. *Anais...*, p. 207-232.
- Dall, W.; Moriarty, D. J. W. Functional aspects of nutrition and digestion. In: Bliss, D. E. *The Biology of Crustacea*, v. 5: Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press, 1983. p. 215 – 261.
- Dall, W. Feeding, digestion and assimilation in penaeidae. In: G. L. Allan and W. Dall (Editors), *proceedings of the aquaculture nutrition workshop*, Salamander Bay, Australia, p. 57-63, 1992.
- Delgado, J. G.; Molina, C.; Cahu, C. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vanamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research*, v. 34, p. 1403 – 1411, 2003.
- Fernández-Gimenez, A. V.; García-Carreño, F. L.; Toro, M. A. N.; Fenucci, J. L. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeidea): partial characterization and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 130 B, p. 331 – 338, 2001.
- Hernández, J. C. S.; Murueta, J. H. C. Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 290, p. 190 – 195, 2009.
- Hindley, J. P. R. Effects of endogenous and some exogenous factors on the activity of juvenile banana prawn *Penaeus merguensis*. *Marine Biology*, v. 29, p. 1-8, 1975.
- Le Moullac, G.; Klein, B.; Sellos, D.; Van Wormhoudt, A. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and  $\alpha$ -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei*

- (Crustacea Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 208, p. 107 – 125, 1996.
- Lee, P. G.; Smith, L. L.; Lawrence, A. L. Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: Relationship between enzyme activity, size and diet. Aquaculture, v. 42, p. 225 – 239, 1984.
- Lemos, D.; Ezquerro, J. M.; García-Carreño, F. L. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. Aquaculture, v. 186, p. 89 – 105, 2000.
- Li, E.; Chen, L.; Zeng, C.; Yu, N.; Xiong, Z.; Chen, X.; Qin, J. G. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. Aquaculture, v. 274, p. 80 – 86, 2008.
- Lima, P. P.; Pontes, C. S.; Arruda, M. F. Activity pattern of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) in laboratory as a function of different feeding frequencies. Aquaculture Research, v. 41, p. 53 – 60, 2009.
- Molina, C.; Llomitoa, E. C.; Orellana, F. Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. In: Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, V, 19-22 noviembre, 2000, Yucatán, México. Anais..., p. 358-380.
- Molina, C.; Escobar, V.; Delgado, J. G.; Llomitoa, E. C.; Orellana, F.; Piña, P. Estrategia de alimentación de acuerdo a la demanda fisiológica del juvenil *Litopenaeus vannamei* (Boone). In: Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, VI, 03-06 septiembre, 2002, Cancún, México. Anais..., p. 98-113.

- Muhlia-Almazán, A.; García-Carreño, F. L. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the White shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 133 B, p. 383 – 394, 2002.
- Pascual, C.; Sánchez, A.; Zenteno, E.; Cuzon, G.; Gaxiola, G.; Brito, R.; Gelabert, R.; Hidalgo, E.; Rosas, C. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 251, p. 416 – 429, 2006.
- Passano, L. M. Molting and its Control. In: Waterman. T. (Ed). *The Physiology of Crustacea*, v. I: Metabolism and Growth. Academic Press, 1960. p. 473-536.
- Pontes, C. S.; Arruda, M. F. Comportamento de *Litopenaeus vannamei* (Boone) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) em função da oferta do alimento artificial nas fases clara e escura do período de 24 horas. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, n. 3, p. 648 – 652, 2005.
- Pontes, C. S.; Arruda, M. F.; Menezes, A. A. L.; Lima, P. P. Daily activity pattern of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) juveniles under laboratory conditions. *Aquaculture research*, v. 37, p. 1001 – 1006, 2006.
- Re, A. D.; Díaz, F.; Valdez, G. Effect of salinity on the thermoregulatory behavior of juvenile blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* Stimpson. *Journal of Thermal Biology*, v. 31, p. 506 – 513, 2006.
- Sánchez-Paz, A.; Garcia-Carreño, F.; Hernández-López, J.; Muhlia-Almazán, A.; Yepiz-Plascencia, G. Effect os short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 340, p. 184 – 193, 2007.
- Wang, Y. B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 269, p. 259 – 264, 2007.

## 8. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho, avaliamos a influência de processos fisiológicos sobre o padrão comportamental do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, nas fases de claro e de escuro. Na tabela 1, pode ser observada uma análise das hipóteses e suas previsões corroboradas ou não.

Tabela 1. Hipóteses e resumo das previsões e dos resultados correspondentes.

| <b>Hipótese 1</b> – O padrão comportamental é indicativo do estágio do ciclo de muda dos camarões. (manuscrito 1)                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                 |                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <b>Predições</b>                                                                                                                                                                                                                                             | <b>Resultados</b>                                                                                                                                                                                               | <b>Conclusão</b>         |
| <b>Predição 1.1:</b> No estágio de intermuda C os camarões expressarão maior frequência de busca e ingestão de alimento, devido o novo exoesqueleto estar totalmente formado.                                                                                | As atividades de busca e ingestão de alimento foram elevadas no estágio C, porém foram significativamente maiores no estágio B.                                                                                 | Não corroborada          |
| <b>Predição 1.2:</b> No estágio de pós-muda A os camarões apresentarão frequências elevadas do parado e enterramento.                                                                                                                                        | Os camarões em estágio A apresentaram frequências elevadas do parado, porém reduzidas do enterramento.                                                                                                          | Parcialmente Corroborada |
| <b>Predição 1.3:</b> Nos estágios de pré-muda tardia (D <sub>2</sub> e D <sub>3</sub> ) os camarões também apresentarão elevadas frequências do parado e enterramento.                                                                                       | Camarões em estágio de pré-muda tardia D <sub>2</sub> ou D <sub>3</sub> apresentaram elevadas frequências de enterramento e parado.                                                                             | Corroborada              |
| <b>Predição 1.4:</b> O comportamento de ingestão de alimento será reduzido nos estágios de pós-muda A e de pré-muda tardia (D <sub>2</sub> e D <sub>3</sub> ), devido a reabsorção do exoesqueleto.                                                          | As menores frequências de ingestão de alimento foram encontradas nos estágios A e D <sub>3</sub> , seguido por D <sub>2</sub> .                                                                                 | Corroborada              |
| <b>Hipótese 2</b> – A fase do fotoperíodo influencia o padrão comportamental. (manuscrito 1)                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                 |                          |
| <b>Predições</b>                                                                                                                                                                                                                                             | <b>Resultados</b>                                                                                                                                                                                               | <b>Conclusão</b>         |
| <b>Predição 2.1:</b> Os comportamentos de maior atividade, como natação e exploração, ocorrerão preferencialmente na fase de escuro, enquanto os comportamentos de menor atividade, como parado e enterramento ocorrerão preferencialmente na fase de claro. | O enterramento ocorreu essencialmente nos estágios de pré muda, sobretudo na fase de claro. O parado foi mais frequente na fase de claro, enquanto natação e exploração foram mais frequentes na fase de escuro | Corroborada              |

| <b>Hipótese 3</b> – O horário e frequência da oferta do alimento influenciam parâmetros da fisiologia digestiva, tais como as atividades de proteases digestivas (manuscrito 2).                                                                                                              |                                                                                                                                                                                   |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| <b>Predições</b>                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>Resultados</b>                                                                                                                                                                 | <b>Conclusão</b> |
| <b>Predição 3.1:</b> O tratamento controle apresentará os maiores valores da atividade de proteases digestivas, pois a alimentação foi mais freqüente.                                                                                                                                        | O tratamento controle, em ambas as fases, apresentaram valores de proteases digestivas estatisticamente superiores ao encontrado nos camarões submetidos ao tratamento alimentar. | Corroborada      |
| <b>Predição 3.2:</b> Os valores da atividade das proteases digestivas flutuarão em função dos horários alimentares.                                                                                                                                                                           | Encontramos valores máximos significativamente maiores que os mínimos de proteases digestivas, com valores intermediários em outros tratamentos.                                  | Corroborada      |
| <b>Hipótese 4</b> – Considerando que o padrão comportamental varia entre as fases do fotoperíodo, os parâmetros da fisiologia digestiva também variarão em função das fases do fotoperíodo (manuscrito 2)                                                                                     |                                                                                                                                                                                   |                  |
| <b>Predições</b>                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>Resultados</b>                                                                                                                                                                 | <b>Conclusão</b> |
| <b>Predição 4.1:</b> Os valores da atividade das proteases digestivas, de modo geral, serão maiores na fase de escuro.                                                                                                                                                                        | De modo geral, não encontramos diferenças, nos parâmetros analisados, entre animais tratados na fase de claro e animais tratados na fase de escuro.                               | Corroborada      |
| <b>Hipótese 5</b> – O padrão comportamental sofre influencia da interação entre oferta alimentar e atividade de proteases digestivas, nas fases de claro ou de escuro. (manuscrito 2)                                                                                                         |                                                                                                                                                                                   |                  |
| <b>Predições</b>                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>Resultados</b>                                                                                                                                                                 | <b>Conclusão</b> |
| <b>Predição 5.1:</b> Na fase de claro, os camarões apresentarão freqüências mais elevadas de busca e ingestão de alimento quando alimentados em horários de maior atividade de proteases digestivas, em relação aos alimentados em horários de menor atividade.                               | Na fase de claro, Os comportamentos de busca e ingestão de alimento foram mais freqüentes em animais alimentados no horário de maior atividade de proteases digestivas.           | Corroborada      |
| <b>Predição 5.2:</b> Na fase de escuro, assim como na fase de claro, os camarões apresentarão freqüências mais elevadas de busca e ingestão de alimento quando alimentados em horários de maior atividade de proteases digestivas, em relação aos alimentados em horários de menor atividade. | Na fase de escuro, não houve diferença na freqüência dos comportamentos de busca e ingestão de alimento entre os horários de alimentação.                                         | Não Corroborada  |

Considerando a importância das respostas comportamentais em diferentes condições fisiológicas para a criação de camarões em cativeiro, esse trabalho contou com a realização de três experimentos. No primeiro experimento, os camarões foram mantidos em aclimação por 8 dias, sendo no 9º dia observados ao longo das fases de claro e de escuro, e no final do dia foi determinado o estágio do ciclo de muda. De modo geral as atividades comportamentais de *L. vannamei* variaram em função do estágio do ciclo de muda e da fase do fotoperíodo.

Como resultado do primeiro experimento percebemos que o comportamento parado foi mais freqüente nos estágios de pós-muda A e pré-muda tardia D<sub>3</sub>, associados à baixa freqüência de exploração e ingestão de alimento. Esses resultados enfatizam a influência dos eventos fisiológicos decorrentes da muda sobre o padrão comportamental, pois nos estágios A e D<sub>3</sub> os camarões estão vulneráveis devido à flacidez do exoesqueleto. A flacidez do exoesqueleto é relatada como necessária para que o camarão possa expandir o corpo e esticar o novo exoesqueleto (Skinner, 1985; Chang, 1995; Barnabé, 1996).

O estágio de pós-muda B é caracterizado pela retomada da alimentação e de atividades de exploração, em contraponto à diminuição dos registros de animais parados. Esse resultado coincide com a recalcificação do novo exoesqueleto, que acarreta uma maior rigidez, e assim o camarão pode buscar, manipular e triturar o alimento. Considerando a baixa freqüência de ingestão de alimentação nos estágios anteriores (A e D<sub>3</sub>), é provável que a elevada freqüência de ingestão de alimento esteja relacionada com o restabelecimento da homeostase do animal.

Outro resultado importante é quanto ao comportamento de enterramento. Esse comportamento é muito influenciado pelas fases do fotoperíodo, sendo essencialmente registrado na fase de claro, sobretudo nos estágios de pré-muda tardia. O enterramento em estágios de pré-muda promove a proteção necessária devido à vulnerabilidade e, ao mesmo tempo otimiza o gasto energético. Nossos dados, assim como os de outros pesquisadores em

nosso laboratório contradizem Penn (1984), que indicam que o *L. vannamei*, são ativos nas fases de claro e de escuro e usualmente não se enterram na fase de claro.

Dado que os eventos associados aos estágios do ciclo de muda são cíclicos, nossos resultados indicam a previsibilidade das respostas comportamentais, quando observados os estágios do ciclo de muda. Assim, sugerimos a incorporação dos conhecimentos acerca dos estágios do ciclo de muda no manejo dos viveiros de camarão, de modo que o manejo alimentar antecipe-se ao desperdício. Além disso, recomendamos a adoção de eventuais biometrias noturnas, visto que nessa fase do fotoperíodo a frequência de enterramento é baixa.

Antes de se avaliar a influencia da atividade de enzimas digestivas proteolíticas no padrão comportamental de *L. vannamei* foi necessário estabelecer qual a hora, da fase de claro e da fase de escuro, de maior e de menor atividade enzimática. Para tanto, realizamos o segundo experimento. Os camarões foram mantidos em adaptação fisiológica por 21 dias em tratamentos alimentares baseados em diferentes horários. No 28º dia foram sacrificados e seu hepatopâncreas coletado para posterior análise da atividade de proteases digestivas específica (tripsina) e não específica.

De modo geral, os resultados mostraram variação significativa da atividade proteolítica em função das fases do fotoperíodo, porém, dentro de cada fase do fotoperíodo, a atividade de proteases digestivas foi diferente em função do horário de alimentação. Corroborando as variações encontradas em nossos resultados, Muhlia-Almazán e Garcia-Carreño (2002) ao estudar a influencia do ciclo de muda e inanição na síntese de enzimas proteolíticas, encontraram na atividade de tripsina entre 5 e 14 unidades enzimáticas. Lee *et al.* (1984), por outro lado, descreveram a relação entre atividade de proteases digestivas, dieta e tamanho de *L. vannamei*. Encontraram uma variação na atividade de protease não específica de 29,8 – 149,3 unidades enzimáticas (U) em camarões de 4 g, de 79,3 – 127,1 U em camarões de 10 g e 106,3 – 156,4 em camarões de 20 g, dependendo da dieta aplicada.

Como conclusão do segundo experimento, identificamos que as maiores atividades de enzimas digestivas proteolíticas convergiam para a 10<sup>o</sup> hora após o início da fase de claro, enquanto as menores atividades convergiram para a 6<sup>o</sup> hora após o início dessa fase. Na fase de escuro, as maiores atividades das mesmas enzimas convergiram para a 12<sup>o</sup> hora após o início dessa fase, enquanto as menores atividades convergiram para a 3<sup>o</sup> hora após o início dessa fase.

Para finalizar, o terceiro experimento tomou como base os horários identificados no segundo experimento e buscou avaliar a resposta comportamental do camarão *L. vannamei*, quando alimentados apenas no horário de maior ou de menor atividade de cada fase do fotoperíodo. Nesse experimento, os camarões foram alimentados durante 28 dias, em seguida foram observados quanto suas atividades comportamentais por mais 12 dias.

Como resultado geral, encontramos que as atividades comportamentais de *L. vannamei* variaram em função do horário da oferta alimentar e da fase do fotoperíodo. A frequência de ingestão de alimento foi significativamente maior em animais alimentados no horário de maior atividade proteolítica da fase de claro, indicando que o horário de oferta alimentar influencia a busca e ingestão de alimento, em camarões alimentados nessa fase. Na fase de escuro, essa influência é reduzida. Esse resultado pode ser resultado do processo adaptativo. Segundo Re *et al.* (2006), a adaptação pode se refletir na expressão comportamental. Em experimento laboratorial, os autores testaram o efeito de diferentes combinações de salinidade e temperatura sobre a “temperatura preferida” pelo *Litopenaeus stylirostris*, definido por eles como comportamento termorregulatório. Para tanto, com o auxílio de um aquecedor, criaram um gradiente termal com variação estável e linear de 10,0 – 33 °C, e evidenciaram que o deslocamento do animal revelou uma temperatura preferida entre 26 – 28,4 °C, independente da salinidade. Lima *et al.* (2009) avaliaram as respostas alimentares de *L. vannamei* em 3 frequências alimentares (3, 4 ou 7 vezes ao dia), encontrando que a frequência de ingestão de

alimento é inversamente proporcional a quantidade de ofertas alimentares, sendo mais freqüente em camarões alimentados 3 vezes ao dia e menos freqüente em camarões alimentados 7 vezes ao dia.

O terceiro experimento nos trouxe a informação que a busca e ingestão de alimento é intensificada quando a ração é ofertada em horários de maior atividade de enzimas digestivas proteolíticas. Assim, recomendamos que a oferta alimentar nos horários de maior resposta comportamental de busca e ingestão de alimento, desse modo o alimento artificial será mais prontamente ingerido, minimizando as perdas por lixiviação.

Os resultados do nosso trabalho demonstram assim que a associação de vários fatores são críticos para o manejo adequado. Nesse contexto, verificamos que o conhecimento da fisiologia e do comportamento da espécie se fazem necessários para permitir a interação dos animais com o ambiente do manejo. A busca pelas condições ideais são uma constante entre pesquisadores e produtores, porque só assim será mantida a sustentabilidade ambiental e econômica da carcinicultura.

## 9. CONCLUSÕES GERAIS

1. Camarões em estágio A do ciclo de muda ficam parados a maior parte do tempo e com pouca ingestão de alimento. Quando em estágio B, a ingestão de alimento é restabelecida, cujo padrão comportamental difere pouco do registrado nos estágios C, D<sub>0</sub> e D<sub>1</sub>. No entanto, quando entram em pré-muda tardia D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> voltam a ficar parados, sem ingerir alimento e freqüentemente se enterram.
2. O fotoperíodo exerce forte influência sobre a natação (mais freqüente na fase de escuro) e enterramento (registrado basicamente na fase de claro). Assim, incorporar essas informações as práticas de manejo pode ser útil, por exemplo, quando for necessário ter uma amostra mais confiável do viveiro de cultivo, sugere-se fazer a biometria à noite, pois os animais estarão desenterrados e ativos.
3. Alguns parâmetros da fisiologia digestiva, como as proteases digestivas, variaram em função do horário de oferta de ração, assim como a resposta comportamental do camarão. Portanto, recomendamos ofertar a maior parte da ração nos horários de melhor resposta a esse estímulo.
4. Na fase de escuro, nossos estudos revelaram que os camarões ingerem alimento tanto quanto na fase de claro, e de uma forma constante ao longo do período. Inclusive, não variando em função do horário de oferta alimentar. Nós consideramos que nas semanas iniciais do cultivo, por não apresentar nenhum grau de degradação da água de cultivo, deveríamos testar uma oferta de ração noturna. Vislumbrando melhores ganhos zootécnicos.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Quaresma, J.; Gominho, M.; Coelho-Aguilar, M. A. Alguns fatores que influenciam a atividade específica de enzimas digestivas de camarões peneídeos: uma revisão. In: Aqüicultura Brasil, 2000. Anais... Florianópolis: Departamento de engenharia de pesca – centro de tecnologia em aqüicultura, 2000. Relação de trabalhos. 1 CD-ROM.
- Almeida-Neto, M. E. Avaliação do consumo alimentar do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae) em cultivo semi-intensivo, durante os estágios do ciclo de muda. Natal, 2003. 86 f. Dissertação (mestrado em Bioecologia Aquática) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Almeida-Neto, M. E.; Freire, A. G. Avaliação de consumo alimentar e textura do exoesqueleto do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae) em cultivo comercial, durante o ciclo de muda. Boletim do Instituto de Pesca. V. 33 (2), p. 147-156. 2007.
- Associação Brasileira De Criadores De Camarão (ABCC). 2008 Censo da Carcinocultura Brasileira em 2004. Disponível em: <[www.abccam.com.br](http://www.abccam.com.br)> Acesso em: 10 de Dezembro de 2010.
- Bachère, E. Shrimp immunity and diseases control. Aquaculture, v. 191, p. 3 – 11, 2000.
- Barnabé, G. Muda. In: \_\_\_\_\_. Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura. España: Acribia, 1996. p. 237-249.
- Ceccaldi, H. La digestión en los crustáceos. In: Monteros, J. E. de los; Labarta, U. Nutrición en acuicultura, v. 1. España: Industrias Gráficas, 1987. p. 67-84.
- Ceccaldi, H. Anatomy and Physiology of the digestive system. In: D'Abramo, L. R., Conklin, D. E. & Akiyama, D. M. (Eds.). Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture, V. 6, p. 261 – 291. Baton Rouge: World Aquaculture Society. 1997.

- Cesar, J. R. O; Zhao, B.; Malecha, S.; Ako, H.; Yang, J. Morphological and biochemical changes in the muscle of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* during the molt cycle. *Aquaculture*, v. 261, p. 688 – 694, 2006.
- Chan, S. M.; Rankin, S. M.; Keeley, L. L. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: Setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *Biological Bulletin*, v. 175, p. 185-192, oct. 1988.
- Córdova-Murueta, J. H.; Garcia-Carreño, F. L.; Navarret-del-Toro, M. L. A. Effect of stressors on shrimp digestive enzymes from assays of feces: an alternate method of evaluation. *Aquaculture*. v. 233, p. 439 – 449, 2004.
- Cruz-Suárez, L. E. Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. In: *Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, V, 19-22 noviembre, 2000, Yucatán, México. *Anais...*, p. 207-232.
- Dall, W.; Moriarty, D. J. W. Functional aspects of nutrition and digestion. In: Bliss, D. E. *The Biology of Crustacea*, v. 5: Internal Anatomy and Physiological Regulation. Academic Press, 1983. p. 215 – 261.
- Dall, W. Feeding, digestion and assimilation in penaeidae. In: G. L. Allan and W. Dall (Editors), *proceedings of the aquaculture nutrition workshop*, Salamander Bay, Australia, p. 57-63, 1992.
- Delgado, J. G. Estudio de la actividad de las enzimas digestivas de *Litopenaeus vannamei* en función del tamaño corporal y la preferencia alimenticia. Ecuador, 2001. 62 f. Disertación (magíster en ciencias) – Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Delgado, J. G.; Molina, C.; Cahu, C. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vanamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research*, v. 34, p. 1403 – 1411, 2003.

- Divakaran, S.; Forster, I. P.; Velasco, M. Limitations on the use of shrimp *Litopenaeus vanamei* midgut gland extract for the measurement of in vitro protein digestibility. *Aquaculture*, v. 239, p. 323 – 329, 2004.
- FAO. The definition of aquaculture and collection of statistics. *Aquaculture Minutes*, Rome, n° 7. 1990.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, 2010. Disponível em: [www.fao.org](http://www.fao.org).
- Fernández-Gimenez, A. V.; García-Carreño, F. L.; Toro, M. A. N.; Fenucci, J. L. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeidea): partial characterization and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 130 B, p. 331 – 338, 2001.
- Focken, U.; Groth, A.; Coloso, R. M.; Becker, K. Contribution of natural food and supplemental feed to the gut content of *Penaeus monodon* Fabricius in a semi-intensive pond system in the Philippines. *Aquaculture*, v. 164, p. 105 – 116, 1998.
- Gaxiola, G.; Cuzon, G.; Garcia, T.; Taboada, G.; Brito, R.; Chimal, M. E.; Paredes, A.; Soto, L.; Rosas, C.; Wormhoudt, A. V. Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moult cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *L. vannamei* (Boone, 1931). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 140, p. 29 – 39, 2005.
- Hindley, J. P. R. Effects of endogenous and some exogenous factors on the activity of juvenile banana prawn *Penaeus merguensis*. *Marine Biology*, v. 29, p. 1-8, 1975.
- Jackson, C.; Preston, N.; Thompson, P. J.; Burford, M. Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. *Aquaculture*, v. 218, p. 397-411, 2003.
- Lemos, D.; Ezquerro, J. M.; García-Carreño, F. L. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*, v. 186, p. 89 – 105, 2000.

- Lemos, D.; Navarrete del Toro, A.; Córdova-Murueta, J. H.; Garcia-Carreño, F. Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: in vitro determination of protein digestibility and proteinase inhibition. *Aquaculture*, v. 239, p. 307 – 321, 2004.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. Principles of Biochemistry. Second Edition. Worth Publishers, Inc., 1993.
- Lima, P. P. Influência da oferta do alimento e da muda no comportamento alimentar do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Natal, 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Llomitoa, E. C. Relación entre el ciclo de muda y la actividad de las enzimas digestivas y su efecto en la tasa de alimentación y el crecimiento del juvenil *Penaeus vannamei*. Ecuador, 2000. 110 f. Monografía (acuicultor) – Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Molina, C.; Llomitoa, E. C.; Orellana, F. Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y ciclo de muda. In: Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, V, 19-22 noviembre, 2000, Yucatán, México. Anais..., p. 358-380.
- Molina, C.; Escobar, V.; Delgado, J. G.; Llomitoa, E. C.; Orellana, F.; Piña, P. Estrategia de alimentación de acuerdo a la demanda fisiológica del juvenil *Litopenaeus vannamei* (Boone). In: Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, VI, 03-06 septiembre, 2002, Cancún, México. Anais..., p. 98-113.
- Muhlia-Almazán, A.; García-Carreño, F. L. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the White shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 133 B, p. 383 – 394, 2002.

- Passano, L. M. Molting and its Control. In: Waterman. T. (Ed). The Physiology of Crustacea, v. I: Metabolism and Growth. Academic Press, 1960. p. 473-536.
- Penn, J. W. The behavior and catchability of some commercially exploited penaeids and their relationships to stock and recruitment. In Gulland, J. A.; Rothschild, B. J. (Eds). Penaeid shrimps: their biology and management. Farnham, England: Books Fishery New Books, 1984, p. 173-186.
- Pinheiro, A. C. A. S.; Lima, A. P. S.; Souza, M. E.; Neto, E. C. L.; Adrião, M.; Gonçalves, V. S. P.; Coimbra, M. R. M. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). Aquaculture, v. 262, p. 17 – 22, 2007.
- Pontes, C. S.; Arruda, M. F. Comportamento de *Litopenaeus vannamei* (Boone) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) em função da oferta do alimento artificial nas fases clara e escura do período de 24 horas. Revista Brasileira de Zoologia, v. 22, n. 3, p. 648 – 652, 2005.
- Pontes, C. S.; Arruda, M. F.; Menezes, A. A. L.; Lima, P. P. Daily activity pattern of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) juveniles under laboratory conditions. Aquaculture research, v. 37, p. 1001 – 1006, 2006.
- Pontes, C. S.; Lima, P. P.; Arruda, M. F. Feeding responses of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed at different frequencies under laboratory conditions. Aquaculture research, v. 39, p. 1416 – 1422, 2008.
- Promwikorn, W.; Kirirat, P.; Intasaro, P.; W, B. Changes in the tegument histology and protein expression related to the molting cycle of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, v. 148, p. 20 – 31, 2007.
- Robertson, L.; Bray, W.; Trujillo, J. L.; Lawrence, A. Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. Journal of the world aquaculture society, v. 18, n. 3, p. 180-185, sept. 1987.

- Rothlisberg, P. C. Aspects of penaeid biology and ecology of relevance to aquaculture: a review. *Aquaculture*, v. 164, p. 49-65, 1998.
- Sainz, J. C.; Garcia-Carreño, F.; Córdova-Murueta, J. H.; Cruz-Hernández, P. Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) isotrypsins: Their genotype and modulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005.
- Skinner, D. M. Molting and regeneration. In: Bliss, D. E. *The Biology of Crustacea*, v. 9: Integument, Pigments, and Hormonal Processes. Academic Press, 1985. p. 43-146.
- Smith, D. M. and Dall, W. Moulting stages of the tiger prawn *Penaeus esculentus*. In: Second Australian National Prawn Seminar. Rothlisberg, P. C.; Hill, B. J.; Staples, D. J. (Editors). Cleveland. Australia. p. 85-95, 1985.
- Smith, D. M.; Burford, M. A.; Tabrett, S. J.; Irvin, S. J.; Ward, L. The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, v. 207, p. 125-136, 2002.
- Vega-Villasante, F.; Nolasco-Soria, H.; Civera-Cerecedo, R.; González-Valdéz, R.; Oliva-Suarez, M. Alternativa para la alimentación del camarón en cultivo: el manejo de la muda. In: Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, V, 19-22 noviembre, 2000, Yucatán, México. *Anais...*, p. 313-320.
- Wormhoudt, A. V.; Le Moullac, G.; Klein, B.; Sellos, D. Caracterización de las tripsinas y amilasas de *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): adaptación a la composición del régimen alimenticio. In: Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, V, 19-22 noviembre, 2000, Yucatán, México. *Anais...*, p. 233 – 250.

## 11. ANEXOS

### 11.1. Anexo 1

Tabela 1. Resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, entre os estágios A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> do ciclo de muda, na fase de claro do fotoperíodo.

| Mann-Whitney<br>entre Estágios |   | Categorias Comportamentais |            |          |           |          |           |
|--------------------------------|---|----------------------------|------------|----------|-----------|----------|-----------|
|                                |   | Parado                     | Exploração | Ingestão | Enterram. | Natação  | Rastejam. |
| A x B                          | U | 6265,5                     | 9788,0     | 11994,0  | 15387,5   | 15214,0  | 16151,5   |
|                                | Z | -9,891                     | -6,493     | -5,883   | -2,903    | -2,246   | -1,297    |
|                                | p | 0,000                      | 0,000      | 0,000    | 0,004     | 0,025    | 0,198     |
| A x C                          | U | 14356,0                    | 28299,5    | 41724,0  | 48735,5   | 39796,5  | 50474,0   |
|                                | Z | -12,773                    | -8,107     | -5,145   | -3,130    | -5,351   | -1,937    |
|                                | p | 0,000                      | 0,000      | 0,000    | 0,002     | 0,000    | 0,053     |
| A x D <sub>0</sub>             | U | 3787,5                     | 5833,0     | 9150,0   | 10633,5   | 8044,0   | 9716,5    |
|                                | Z | -9,586                     | -6,867     | -4,030   | -1,654    | -5,051   | -2,985    |
|                                | p | 0,000                      | 0,000      | 0,000    | 0,098     | 0,000    | 0,003     |
| A x D <sub>1</sub>             | U | 3265,5                     | 5639,5     | 8726,0   | 10963,5   | 8655,0   | 10457,5   |
|                                | Z | -10,637                    | -7,576     | -5,236   | -2,240    | -4,848   | -2,633    |
|                                | p | 0,000                      | 0,000      | 0,000    | 0,025     | 0,000    | 0,008     |
| A x D <sub>2</sub>             | U | 3332,5                     | 5125,0     | 6404,0   | 7092,0    | 6544,5   | 7167,0    |
|                                | Z | -7,760                     | -4,599     | -3,942   | -2,783    | -3,069   | -1,987    |
|                                | p | 0,000                      | 0,000      | 0,000    | 0,005     | 0,002    | 0,047     |
| A x D <sub>3</sub>             | U | 3775,5                     | 6303,5     | 6114,0   | 4759,5    | 6423,0   | 6389,0    |
|                                | Z | -5,484                     | -0,364     | -1,713   | -5,601    | -0,215   | -0,542    |
|                                | p | 0,000                      | 0,716      | 0,087    | 0,000     | 0,829    | 0,588     |
| B x C                          | U | 136808,0                   | 143771,5   | 145319,0 | 153403,0  | 128628,5 | 151219,5  |
|                                | Z | -3,137                     | -1,867     | -2,046   | -0,386    | -5,489   | -1,093    |
|                                | p | 0,002                      | 0,062      | 0,041    | 0,699     | 0,000    | 0,275     |
| B x D <sub>0</sub>             | U | 31190,0                    | 31359,0    | 28527,0  | 30150,5   | 26038,5  | 29092,5   |
|                                | Z | -0,327                     | -0,220     | -2,476   | -2,100    | -4,505   | -2,838    |
|                                | p | 0,744                      | 0,826      | 0,013    | 0,036     | 0,000    | 0,005     |
| B x D <sub>1</sub>             | U | 30236,0                    | 30151,0    | 32191,5  | 32486,5   | 27980,0  | 31316,0   |
|                                | Z | -1,903                     | -1,921     | -0,894   | -1,162    | -4,187   | -2,256    |
|                                | p | 0,057                      | 0,055      | 0,371    | 0,245     | 0,000    | 0,024     |
| B x D <sub>2</sub>             | U | 21309,5                    | 20720,5    | 19719,0  | 22225,5   | 20946,5  | 21456,0   |
|                                | Z | -0,726                     | -1,172     | -2,451   | -0,017    | -1,405   | -1,171    |
|                                | p | 0,468                      | 0,241      | 0,014    | 0,987     | 0,160    | 0,241     |
| B x D <sub>3</sub>             | U | 15997,0                    | 11910,0    | 14387,0  | 15182,5   | 17097,0  | 17653,5   |
|                                | Z | -2,338                     | -5,866     | -4,831   | -4,927    | -2,078   | -1,939    |
|                                | p | 0,019                      | 0,000      | 0,000    | 0,000     | 0,038    | 0,052     |
| C x D <sub>0</sub>             | U | 86991,5                    | 94764,5    | 96868,5  | 95552,5   | 100387,5 | 95119,0   |
|                                | Z | -3,274                     | -1,476     | -1,332   | -2,589    | -0,263   | -2,483    |
|                                | p | 0,001                      | 0,140      | 0,183    | 0,010     | 0,793    | 0,013     |
| C x D <sub>1</sub>             | U | 104517,0                   | 104106,5   | 104445,5 | 102996,0  | 106281,5 | 102375,5  |
|                                | Z | -0,517                     | -0,594     | -0,675   | -1,634    | -0,146   | -1,738    |
|                                | p | 0,605                      | 0,553      | 0,499    | 0,102     | 0,884    | 0,082     |
| C x D <sub>2</sub>             | U | 60373,0                    | 61490,5    | 67354,5  | 70490,0   | 63097,5  | 70074,0   |
|                                | Z | -2,988                     | -2,618     | -1,338   | -0,304    | -2,601   | -0,500    |
|                                | p | 0,003                      | 0,009      | 0,181    | 0,761     | 0,009    | 0,617     |
| C x D <sub>3</sub>             | U | 45584,5                    | 35214,5    | 49709,5  | 48896,5   | 44920,0  | 55121,5   |
|                                | Z | -4,331                     | -7,368     | -4,009   | -5,718    | -5,363   | -2,602    |

|                                      |          |         |         |         |         |         |         |
|--------------------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                                      | <b>p</b> | 0,000   | 0,000   | 0,000   | 0,000   | 0,000   | 0,009   |
| <b>D<sub>0</sub> x D<sub>1</sub></b> | <b>U</b> | 19266,5 | 19830,0 | 20489,5 | 21465,0 | 21591,0 | 21472,0 |
|                                      | <b>Z</b> | -2,185  | -1,700  | -1,551  | -0,951  | -0,323  | -0,583  |
|                                      | <b>p</b> | 0,029   | 0,089   | 0,121   | 0,342   | 0,747   | 0,560   |
| <b>D<sub>0</sub> x D<sub>2</sub></b> | <b>U</b> | 14254,5 | 13394,5 | 14490,5 | 13887,0 | 12781,0 | 13925,5 |
|                                      | <b>Z</b> | -0,365  | -1,300  | -0,148  | -1,800  | -2,404  | -1,167  |
|                                      | <b>p</b> | 0,715   | 0,194   | 0,882   | 0,072   | 0,016   | 0,243   |
| <b>D<sub>0</sub> x D<sub>3</sub></b> | <b>U</b> | 10642,0 | 7416,0  | 10816,0 | 9377,5  | 9085,0  | 10584,5 |
|                                      | <b>Z</b> | -1,987  | -5,970  | -2,737  | -6,035  | -5,015  | -3,640  |
|                                      | <b>p</b> | 0,047   | 0,000   | 0,006   | 0,000   | 0,000   | 0,000   |
| <b>D<sub>1</sub> x D<sub>2</sub></b> | <b>U</b> | 13331,0 | 12938,0 | 14199,0 | 14955,0 | 13722,5 | 14974,0 |
|                                      | <b>Z</b> | -2,173  | -2,548  | -1,614  | -0,951  | -2,124  | -0,696  |
|                                      | <b>p</b> | 0,030   | 0,011   | 0,107   | 0,341   | 0,034   | 0,487   |
| <b>D<sub>1</sub> x D<sub>3</sub></b> | <b>U</b> | 10059,0 | 7278,5  | 10425,5 | 10146,5 | 9769,0  | 11393,5 |
|                                      | <b>Z</b> | -3,414  | -6,669  | -4,077  | -5,378  | -4,806  | -3,299  |
|                                      | <b>p</b> | 0,001   | 0,000   | 0,000   | 0,000   | 0,000   | 0,001   |
| <b>D<sub>2</sub> x D<sub>3</sub></b> | <b>U</b> | 7741,5  | 6056,5  | 7599,5  | 7004,5  | 7368,0  | 7832,5  |
|                                      | <b>Z</b> | -1,388  | -4,170  | -2,555  | -3,891  | -2,932  | -2,589  |
|                                      | <b>p</b> | 0,165   | 0,000   | 0,011   | 0,000   | 0,003   | 0,010   |

Tabela 2. Resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, entre os estágios A, B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> do ciclo de muda, na fase de escuro do fotoperíodo.

| Mann-Whitney<br>entre Estágios |          | Categorias Comportamentais |            |          |           |          |           |
|--------------------------------|----------|----------------------------|------------|----------|-----------|----------|-----------|
|                                |          | Parado                     | Exploração | Ingestão | Enterram. | Natação  | Rastejam. |
| <b>A x B</b>                   | <b>U</b> | 19770,5                    | 20483,5    | 28305,5  | 32742,0   | 32230,5  | 27301,0   |
|                                | <b>Z</b> | -7,731                     | -7,304     | -4,131   | -0,796    | -0,419   | -3,918    |
|                                | <b>p</b> | 0,000                      | 0,000      | 0,000    | 0,426     | 0,675    | 0,000     |
| <b>A x C</b>                   | <b>U</b> | 38819,5                    | 43959,5    | 75452,0  | 89964,0   | 85468,5  | 68865,0   |
|                                | <b>Z</b> | -12,994                    | -11,557    | -5,257   | -1,519    | -1,515   | -7,337    |
|                                | <b>p</b> | 0,000                      | 0,000      | 0,000    | 0,129     | 0,130    | 0,000     |
| <b>A x D<sub>0</sub></b>       | <b>U</b> | 16587,0                    | 18508,0    | 24941,0  | 30396,0   | 30170,5  | 23834,0   |
|                                | <b>Z</b> | -8,783                     | -7,566     | -5,128   | -1,167    | -0,307   | -5,232    |
|                                | <b>p</b> | 0,000                      | 0,000      | 0,000    | 0,243     | 0,759    | 0,000     |
| <b>A x D<sub>1</sub></b>       | <b>U</b> | 11690,5                    | 12523,0    | 16858,5  | 20808,0   | 18194,0  | 18182,0   |
|                                | <b>Z</b> | -7,689                     | -6,984     | -4,966   | 0,000     | -2,431   | -2,585    |
|                                | <b>p</b> | 0,000                      | 0,000      | 0,000    | 1,000     | 0,015    | 0,010     |
| <b>A x D<sub>2</sub></b>       | <b>U</b> | 12432,5                    | 11188,0    | 15307,0  | 17136,0   | 15455,0  | 12465,5   |
|                                | <b>Z</b> | -4,572                     | -5,793     | -3,016   | 0,000     | -1,930   | -5,548    |
|                                | <b>p</b> | 0,000                      | 0,000      | 0,003    | 1,000     | 0,054    | 0,000     |
| <b>A x D<sub>3</sub></b>       | <b>U</b> | 12965,0                    | 11712,0    | 13361,5  | 13464,0   | 12765,5  | 11595,5   |
|                                | <b>Z</b> | -0,576                     | -2,028     | -0,242   | 0,000     | -0,937   | -2,480    |
|                                | <b>p</b> | 0,565                      | 0,043      | 0,809    | 1,000     | 0,349    | 0,013     |
| <b>B x C</b>                   | <b>U</b> | 116163,0                   | 122177,5   | 139425,5 | 142445,5  | 132255,0 | 132015,5  |
|                                | <b>Z</b> | -5,190                     | -3,984     | -1,034   | -1,318    | -2,372   | -3,024    |
|                                | <b>p</b> | 0,000                      | 0,000      | 0,301    | 0,188     | 0,018    | 0,002     |
| <b>B x D<sub>0</sub></b>       | <b>U</b> | 44697,5                    | 46562,0    | 46270,0  | 48127,0   | 46740,0  | 45475,0   |
|                                | <b>Z</b> | -1,627                     | -0,778     | -1,209   | -0,644    | -0,805   | -1,684    |
|                                | <b>p</b> | 0,104                      | 0,437      | 0,227    | 0,520     | 0,421    | 0,092     |
| <b>B x D<sub>1</sub></b>       | <b>U</b> | 31333,0                    | 32688,5    | 31456,0  | 32742,0   | 28058,5  | 31804,0   |
|                                | <b>Z</b> | -0,899                     | -0,092     | -1,093   | -0,796    | -3,163   | -0,778    |
|                                | <b>p</b> | 0,369                      | 0,927      | 0,275    | 0,426     | 0,002    | 0,437     |

|                                      |          |          |          |          |          |          |          |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>B x D<sub>2</sub></b>             | <b>U</b> | 23934,0  | 26676,5  | 26075,0  | 26964,0  | 24903,5  | 24131,5  |
|                                      | <b>Z</b> | -2,109   | -0,250   | -0,922   | -0,722   | -1,711   | -2,642   |
|                                      | <b>p</b> | 0,035    | 0,802    | 0,356    | 0,470    | 0,087    | 0,008    |
| <b>B x D<sub>3</sub></b>             | <b>U</b> | 12943,5  | 15110,5  | 18462,5  | 21186,0  | 20554,5  | 20483,5  |
|                                      | <b>Z</b> | -6,577   | -4,850   | -3,277   | -0,640   | -0,644   | -0,765   |
|                                      | <b>p</b> | 0,000    | 0,000    | 0,001    | 0,522    | 0,519    | 0,445    |
| <b>C x D<sub>0</sub></b>             | <b>U</b> | 118918,0 | 119535,5 | 132161,5 | 133196,0 | 127667,0 | 130894,5 |
|                                      | <b>Z</b> | -2,950   | -2,773   | -0,415   | -0,677   | -1,333   | -0,818   |
|                                      | <b>p</b> | 0,003    | 0,006    | 0,678    | 0,498    | 0,182    | 0,413    |
| <b>C x D<sub>1</sub></b>             | <b>U</b> | 78088,5  | 76290,0  | 89917,0  | 89964,0  | 85535,5  | 81245,5  |
|                                      | <b>Z</b> | -3,232   | -3,612   | -0,342   | -1,519   | -1,477   | -3,379   |
|                                      | <b>p</b> | 0,001    | 0,000    | 0,733    | 0,129    | 0,140    | 0,001    |
| <b>C x D<sub>2</sub></b>             | <b>U</b> | 52572,0  | 63238,0  | 69872,0  | 74088,0  | 62814,5  | 73060,0  |
|                                      | <b>Z</b> | -6,268   | -3,220   | -1,851   | -1,378   | -3,755   | -0,759   |
|                                      | <b>p</b> | 0,000    | 0,001    | 0,064    | 0,168    | 0,000    | 0,448    |
| <b>C x D<sub>3</sub></b>             | <b>U</b> | 24605,0  | 31996,0  | 49230,0  | 58212,0  | 52214,0  | 51839,0  |
|                                      | <b>Z</b> | -11,001  | -8,494   | -4,123   | -1,222   | -2,356   | -3,152   |
|                                      | <b>p</b> | 0,000    | 0,000    | 0,000    | 0,222    | 0,018    | 0,002    |
| <b>D<sub>0</sub> x D<sub>1</sub></b> | <b>U</b> | 29707,0  | 29280,0  | 30572,0  | 30396,0  | 27254,5  | 27968,5  |
|                                      | <b>Z</b> | -0,564   | -0,825   | -0,022   | -1,167   | -2,316   | -2,189   |
|                                      | <b>p</b> | 0,573    | 0,410    | 0,982    | 0,243    | 0,021    | 0,029    |
| <b>D<sub>0</sub> x D<sub>2</sub></b> | <b>U</b> | 20553,0  | 24027,5  | 23168,5  | 25032,0  | 22375,0  | 24016,0  |
|                                      | <b>Z</b> | -3,346   | -0,838   | -1,936   | -1,059   | -2,359   | -1,224   |
|                                      | <b>p</b> | 0,001    | 0,402    | 0,053    | 0,289    | 0,018    | 0,221    |
| <b>D<sub>0</sub> x D<sub>3</sub></b> | <b>U</b> | 10764,5  | 13489,0  | 16281,5  | 19668,0  | 18507,5  | 17888,5  |
|                                      | <b>Z</b> | -7,611   | -5,293   | -4,114   | -0,939   | -1,251   | -2,135   |
|                                      | <b>p</b> | 0,000    | 0,000    | 0,000    | 0,348    | 0,211    | 0,033    |
| <b>D<sub>1</sub> x D<sub>2</sub></b> | <b>U</b> | 14429,0  | 16930,0  | 15723,5  | 17136,0  | 13123,0  | 14857,5  |
|                                      | <b>Z</b> | -2,645   | -0,200   | -1,840   | 0,000    | -4,381   | -2,984   |
|                                      | <b>p</b> | 0,008    | 0,841    | 0,066    | 1,000    | 0,000    | 0,003    |
| <b>D<sub>1</sub> x D<sub>3</sub></b> | <b>U</b> | 7606,0   | 9215,5   | 11008,5  | 13464,0  | 10999,0  | 13422,0  |
|                                      | <b>Z</b> | -6,769   | -4,897   | -4,027   | 0,000    | -3,144   | -0,060   |
|                                      | <b>p</b> | 0,000    | 0,000    | 0,000    | 1,000    | 0,002    | 0,952    |
| <b>D<sub>2</sub> x D<sub>3</sub></b> | <b>U</b> | 8240,0   | 8259,0   | 9990,0   | 11088,0  | 10586,0  | 9448,5   |
|                                      | <b>Z</b> | -3,831   | -3,804   | -2,393   | 0,000    | -0,817   | -2,983   |
|                                      | <b>p</b> | 0,000    | 0,000    | 0,017    | 1,000    | 0,414    | 0,003    |

## 11.2. Anexo 2

Tabela 3. Descrição de média ( $\pm$  erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, por fases do fotoperíodo, em estágio A do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.

| Fotoperíodo                                  | Categorias Comportamentais |                      |                      |                      |                      |                      |
|----------------------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                              | Parado                     | Exploração           | Ingestão             | Enterram.            | Natação              | Rastejam.            |
| <b>Fase de Claro</b>                         | 11,130<br>$\pm$ 0,408      | 3,407 $\pm$<br>0,375 | 0,037 $\pm$<br>0,018 | 0,139 $\pm$<br>0,138 | 0,120 $\pm$<br>0,038 | 0,167 $\pm$<br>0,088 |
| <b>Fase de Escuro</b>                        | 8,662 $\pm$<br>0,353       | 4,392 $\pm$<br>0,306 | 0,275 $\pm$<br>0,088 | 0,000 $\pm$<br>0,000 | 0,985 $\pm$<br>0,134 | 0,686 $\pm$<br>0,069 |
| <b>Mann-Whitney<br/>entre Claro e Escuro</b> | <b>U</b>                   | 7812,5               | 9744,0               | 10484,0              | 10914,0              | 7786,5               |
|                                              | <b>Z</b>                   | -4,247               | -1,699               | -1,616               | -1,374               | -5,381               |
|                                              | <b>p</b>                   | 0,000                | 0,089                | 0,106                | 0,169                | 0,000                |

Tabela 4. Descrição de média ( $\pm$  erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, por fases do fotoperíodo, em estágio B do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.

| Fotoperíodo                       |   | Categorias Comportamentais |                   |                   |                   |                   |                   |
|-----------------------------------|---|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                   |   | Parado                     | Exploração        | Ingestão          | Enterram.         | Natação           | Rastejam.         |
| Fase de Claro                     |   | 4,698 $\pm$ 0,294          | 7,206 $\pm$ 0,289 | 1,341 $\pm$ 0,164 | 1,257 $\pm$ 0,229 | 0,350 $\pm$ 0,053 | 0,138 $\pm$ 0,029 |
| Fase de Escuro                    |   | 5,003 $\pm$ 0,286          | 7,531 $\pm$ 0,267 | 1,161 $\pm$ 0,170 | 0,009 $\pm$ 0,009 | 0,898 $\pm$ 0,098 | 0,398 $\pm$ 0,044 |
| Mann-Whitney entre Claro e Escuro | U | 46952,0                    | 48211,0           | 45565,0           | 45544,0           | 40904,5           | 40836,0           |
|                                   | Z | -1,373                     | -0,811            | -2,523            | -5,346            | -5,059            | -5,985            |
|                                   | p | 0,170                      | 0,417             | 0,012             | 0,000             | 0,000             | 0,000             |

Tabela 5. Descrição de média ( $\pm$  erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, por fases do fotoperíodo, em estágio C do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.

| Fotoperíodo                       |   | Categorias Comportamentais |                   |                   |                   |                   |                   |
|-----------------------------------|---|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                   |   | Parado                     | Exploração        | Ingestão          | Enterram.         | Natação           | Rastejam.         |
| Fase de Claro                     |   | 3,543 $\pm$ 0,145          | 7,825 $\pm$ 0,163 | 1,228 $\pm$ 0,100 | 1,240 $\pm$ 0,126 | 0,969 $\pm$ 0,064 | 0,194 $\pm$ 0,024 |
| Fase de Escuro                    |   | 3,386 $\pm$ 0,144          | 8,809 $\pm$ 0,148 | 1,164 $\pm$ 0,100 | 0,113 $\pm$ 0,041 | 1,164 $\pm$ 0,064 | 0,364 $\pm$ 0,037 |
| Mann-Whitney entre Claro e Escuro | U | 442724,5                   | 400189,0          | 442109,0          | 403178,0          | 404856,0          | 407790,5          |
|                                   | Z | -0,052                     | -3,663            | -0,135            | -8,337            | -3,737            | -4,901            |
|                                   | p | 0,958                      | 0,000             | 0,893             | 0,000             | 0,000             | 0,000             |

Tabela 6. Descrição de média ( $\pm$  erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, por fases do fotoperíodo, em estágio D<sub>0</sub> do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.

| Fotoperíodo                       |   | Categorias Comportamentais |                   |                   |                   |                   |                   |
|-----------------------------------|---|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                   |   | Parado                     | Exploração        | Ingestão          | Enterram.         | Natação           | Rastejam.         |
| Fase de Claro                     |   | 4,549 $\pm$ 0,342          | 7,348 $\pm$ 0,329 | 1,255 $\pm$ 0,232 | 0,534 $\pm$ 0,187 | 0,882 $\pm$ 0,110 | 0,431 $\pm$ 0,094 |
| Fase de Escuro                    |   | 4,413 $\pm$ 0,291          | 7,843 $\pm$ 0,283 | 1,187 $\pm$ 0,175 | 0,100 $\pm$ 0,070 | 1,053 $\pm$ 0,114 | 0,403 $\pm$ 0,068 |
| Mann-Whitney entre Claro e Escuro | U | 29663,5                    | 28645,0           | 28944,5           | 29457,0           | 29618,0           | 29474,0           |
|                                   | Z | -0,591                     | -1,221            | -1,378            | -2,814            | -0,707            | -1,021            |
|                                   | p | 0,554                      | 0,222             | 0,168             | 0,005             | 0,480             | 0,307             |

Tabela 7. Descrição de média ( $\pm$  erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, por fases do fotoperíodo, em estágio D<sub>1</sub> do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.

| Fotoperíodo                       |   | Categorias Comportamentais |                   |                   |                   |                   |                   |
|-----------------------------------|---|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                   |   | Parado                     | Exploração        | Ingestão          | Enterram.         | Natação           | Rastejam.         |
| Fase de Claro                     | 2 | 4,549 $\pm$ 0,342          | 7,348 $\pm$ 0,329 | 1,255 $\pm$ 0,232 | 0,534 $\pm$ 0,187 | 0,882 $\pm$ 0,110 | 0,431 $\pm$ 0,094 |
| Fase de Escuro                    | 2 | 4,583 $\pm$ 0,291          | 7,564 $\pm$ 0,314 | 0,956 $\pm$ 0,170 | 0,000 $\pm$ 0,000 | 1,221 $\pm$ 0,129 | 0,676 $\pm$ 0,113 |
| Mann-Whitney entre Claro e Escuro | U | 19414,5                    | 20350,0           | 21595,5           | 20502,0           | 18481,0           | 18812,0           |
|                                   | Z | -2,066                     | -1,278            | -0,343            | -3,702            | -3,120            | -3,495            |
|                                   | p | 0,039                      | 0,201             | 0,732             | 0,000             | 0,002             | 0,000             |

Tabela 8. Descrição de média ( $\pm$  erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, por fases do fotoperíodo, em estágio D<sub>2</sub> do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.

| Fotoperíodo                       |   | Categorias Comportamentais |                   |                   |                   |                   |                   |
|-----------------------------------|---|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                   |   | Parado                     | Exploração        | Ingestão          | Enterram.         | Natação           | Rastejam.         |
| Fase de Claro                     |   | 5,189 $\pm$ 0,461          | 6,636 $\pm$ 0,434 | 0,888 $\pm$ 0,218 | 1,357 $\pm$ 0,360 | 0,483 $\pm$ 0,090 | 0,448 $\pm$ 0,144 |
| Fase de Escuro                    |   | 6,131 $\pm$ 0,423          | 7,393 $\pm$ 0,391 | 0,720 $\pm$ 0,177 | 0,000 $\pm$ 0,000 | 0,500 $\pm$ 0,072 | 0,256 $\pm$ 0,059 |
| Mann-Whitney entre Claro e Escuro | U | 10617,0                    | 10860,0           | 11808,5           | 10920,0           | 11395,5           | 11523,0           |
|                                   | Z | -1,782                     | -1,463            | -0,372            | -3,986            | -0,993            | -1,012            |
|                                   | p | 0,075                      | 0,144             | 0,710             | 0,000             | 0,321             | 0,311             |

Tabela 9. Descrição de média ( $\pm$  erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, por fases do fotoperíodo, em estágio D<sub>3</sub> do ciclo da muda. Incluindo resultados do teste U de Mann-Whitney na comparação entre as fases de claro e de escuro.

| Fotoperíodo                       |   | Categorias Comportamentais |                   |                   |                   |                   |                   |
|-----------------------------------|---|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                   |   | Parado                     | Exploração        | Ingestão          | Enterram.         | Natação           | Rastejam.         |
| Fase de Claro                     |   | 6,550 $\pm$ 0,557          | 4,025 $\pm$ 0,456 | 0,267 $\pm$ 0,103 | 3,950 $\pm$ 0,599 | 0,167 $\pm$ 0,052 | 0,042 $\pm$ 0,021 |
| Fase de Escuro                    |   | 8,492 $\pm$ 0,413          | 5,061 $\pm$ 0,363 | 0,280 $\pm$ 0,111 | 0,000 $\pm$ 0,000 | 0,750 $\pm$ 0,134 | 0,417 $\pm$ 0,065 |
| Mann-Whitney entre Claro e Escuro | U | 6398,0                     | 5982,0            | 7917,5            | 5742,0            | 6033,5            | 5667,5            |
|                                   | Z | -2,646                     | -3,389            | -0,009            | -6,445            | -4,438            | -5,507            |
|                                   | p | 0,008                      | 0,001             | 0,993             | 0,000             | 0,000             | 0,000             |

### 11.3. Anexo 3

Tabela 10. Descrição de média ( $\pm$  DP) e valores máximo e mínimo da atividade de protease específica tripsina de *L. vannamei* por tratamento alimentar, dentre fases do fotoperíodo. Valores em mU.mg<sup>-1</sup> de proteína.

| FASE DE CLARO |                   |        |        | FASE DE ESCURO |                   |        |        |
|---------------|-------------------|--------|--------|----------------|-------------------|--------|--------|
|               | Média $\pm$ DP    | Mínimo | Máximo |                | Média $\pm$ DP    | Mínimo | Máximo |
| <b>T1</b>     | 8,813 $\pm$ 1,926 | 4,253  | 11,543 | <b>T1</b>      | 8,670 $\pm$ 2,039 | 4,456  | 12,207 |
| <b>T2</b>     | 7,779 $\pm$ 1,586 | 4,008  | 11,112 | <b>T2</b>      | 7,325 $\pm$ 1,491 | 3,045  | 9,662  |
| <b>T3</b>     | 7,512 $\pm$ 1,677 | 3,451  | 9,929  | <b>T3</b>      | 7,186 $\pm$ 1,578 | 3,050  | 9,626  |
| <b>T4</b>     | 7,583 $\pm$ 2,099 | 3,776  | 12,244 | <b>T4</b>      | 7,648 $\pm$ 1,796 | 2,894  | 10,618 |
| <b>T5</b>     | 7,765 $\pm$ 1,851 | 4,250  | 11,965 | <b>T5</b>      | 7,667 $\pm$ 2,483 | 3,014  | 11,600 |
| <b>T6</b>     | 7,699 $\pm$ 1,844 | 4,370  | 12,212 | <b>T6</b>      | 8,424 $\pm$ 2,302 | 4,695  | 14,079 |
| <b>T7</b>     | 7,902 $\pm$ 2,249 | 4,359  | 12,215 | <b>T7</b>      | 8,084 $\pm$ 2,418 | 4,290  | 13,287 |
| <b>T8</b>     | 8,015 $\pm$ 2,262 | 4,322  | 13,905 | <b>T8</b>      | 8,895 $\pm$ 2,259 | 4,657  | 14,027 |
| <b>T9</b>     | 8,475 $\pm$ 2,424 | 4,403  | 13,776 | <b>T9</b>      | 8,274 $\pm$ 2,400 | 2,792  | 12,630 |
| <b>T10</b>    | 9,285 $\pm$ 2,021 | 5,329  | 14,599 | <b>T10</b>     | 9,087 $\pm$ 1,636 | 5,077  | 11,545 |
| <b>T11</b>    | 8,284 $\pm$ 1,650 | 5,473  | 11,461 | <b>T11</b>     | 8,813 $\pm$ 1,963 | 3,641  | 12,392 |
| <b>T12</b>    | 8,709 $\pm$ 1,908 | 3,955  | 11,786 | <b>T12</b>     | 9,412 $\pm$ 1,943 | 5,821  | 13,130 |

Tabela 11. Descrição de média ( $\pm$  DP) e valores máximo e mínimo da atividade de protease não específica de *L. vannamei* por tratamento alimentar, dentre fases do fotoperíodo. Valores em U.mg<sup>-1</sup> de proteína.

| FASE DE CLARO |                     |        |         | FASE DE ESCURO |                     |        |         |
|---------------|---------------------|--------|---------|----------------|---------------------|--------|---------|
|               | Média $\pm$ DP      | Mínimo | Máximo  |                | Média $\pm$ DP      | Mínimo | Máximo  |
| <b>T1</b>     | 79,187 $\pm$ 13,746 | 50,204 | 102,565 | <b>T1</b>      | 76,566 $\pm$ 14,862 | 50,301 | 111,481 |
| <b>T2</b>     | 71,259 $\pm$ 11,711 | 45,412 | 95,235  | <b>T2</b>      | 66,912 $\pm$ 14,715 | 28,672 | 96,287  |
| <b>T3</b>     | 68,200 $\pm$ 11,855 | 33,494 | 87,450  | <b>T3</b>      | 63,650 $\pm$ 11,911 | 31,097 | 77,458  |
| <b>T4</b>     | 71,223 $\pm$ 16,577 | 34,033 | 106,047 | <b>T4</b>      | 67,174 $\pm$ 13,442 | 30,477 | 85,279  |
| <b>T5</b>     | 69,070 $\pm$ 12,600 | 39,485 | 95,836  | <b>T5</b>      | 66,931 $\pm$ 13,650 | 32,670 | 88,998  |
| <b>T6</b>     | 63,093 $\pm$ 16,871 | 30,823 | 103,382 | <b>T6</b>      | 77,379 $\pm$ 32,815 | 38,407 | 158,167 |
| <b>T7</b>     | 62,094 $\pm$ 15,547 | 35,421 | 92,593  | <b>T7</b>      | 74,607 $\pm$ 33,213 | 35,194 | 151,805 |
| <b>T8</b>     | 65,073 $\pm$ 21,918 | 33,349 | 121,182 | <b>T8</b>      | 75,992 $\pm$ 30,512 | 34,232 | 137,184 |
| <b>T9</b>     | 70,446 $\pm$ 23,423 | 33,976 | 116,454 | <b>T9</b>      | 77,743 $\pm$ 30,301 | 38,659 | 135,926 |
| <b>T10</b>    | 78,285 $\pm$ 13,940 | 50,777 | 100,591 | <b>T10</b>     | 74,516 $\pm$ 10,419 | 43,859 | 91,075  |
| <b>T11</b>    | 75,486 $\pm$ 14,267 | 35,602 | 97,988  | <b>T11</b>     | 72,845 $\pm$ 11,140 | 51,022 | 93,933  |
| <b>T12</b>    | 73,911 $\pm$ 15,818 | 30,945 | 95,856  | <b>T12</b>     | 79,658 $\pm$ 14,834 | 48,725 | 105,251 |

Tabela 12. Valores do teste U de Mann-Whitney na comparação da atividade de protease não específica de *L. vannamei* entre tratamentos alimentares da fase de escuro do fotoperíodo. TC corresponde ao tratamento controle.

| Mann-Whitney entre os Ttratamentos alimentares |       |        |       |        |       |        |       |         |       |        |       |
|------------------------------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|---------|-------|--------|-------|
|                                                | U     | Z      | p     |        | U     | Z      | p     |         | U     | Z      | p     |
| TCxT1                                          | 331,0 | -2,234 | 0,025 | T2xT6  | 550,0 | -0,126 | 0,900 | T5xT8   | 457,0 | -0,324 | 0,746 |
| TCxT2                                          | 178,0 | -4,130 | 0,000 | T2xT7  | 512,0 | -0,411 | 0,681 | T5xT9   | 538,0 | -0,467 | 0,641 |
| TCxT3                                          | 121,0 | -5,044 | 0,000 | T2xT8  | 463,0 | -0,239 | 0,811 | T5xT10  | 347,0 | -2,375 | 0,018 |
| TCxT4                                          | 164,0 | -4,333 | 0,000 | T2xT9  | 547,0 | -0,356 | 0,722 | T5xT11  | 425,0 | -1,695 | 0,090 |
| TCxT5                                          | 169,0 | -4,260 | 0,000 | T2xT10 | 342,0 | -2,441 | 0,015 | T5xT12  | 314,0 | -3,219 | 0,001 |
| TCxT6                                          | 367,0 | -1,895 | 0,058 | T2xT11 | 423,0 | -1,720 | 0,085 | T6xT7   | 560,0 | -0,420 | 0,674 |
| TCxT7                                          | 322,0 | -2,358 | 0,018 | T2xT12 | 316,0 | -3,195 | 0,001 | T6xT8   | 507,0 | -0,237 | 0,813 |
| TCxT8                                          | 297,0 | -2,092 | 0,036 | T3xT4  | 413,0 | -1,509 | 0,131 | T6xT9   | 597,0 | -0,380 | 0,704 |
| TCxT9                                          | 369,0 | -1,663 | 0,096 | T3xT5  | 468,0 | -0,787 | 0,431 | T6xT10  | 466,0 | -1,368 | 0,171 |
| TCxT10                                         | 256,0 | -3,139 | 0,002 | T3xT6  | 544,0 | -0,411 | 0,681 | T6xT11  | 518,0 | -1,110 | 0,267 |
| TCxT11                                         | 253,0 | -3,432 | 0,001 | T3xT7  | 559,0 | -0,025 | 0,980 | T6xT12  | 488,0 | -1,633 | 0,102 |
| TCxT12                                         | 426,0 | -1,267 | 0,205 | T3xT8  | 451,0 | -0,606 | 0,545 | T7xT8   | 461,0 | -0,659 | 0,510 |
| T1xT2                                          | 362,0 | -2,335 | 0,020 | T3xT9  | 526,0 | -0,817 | 0,414 | T7xT9   | 554,0 | -0,682 | 0,496 |
| T1xT3                                          | 304,0 | -3,223 | 0,001 | T3xT10 | 252,0 | -3,751 | 0,000 | T7xT10  | 427,0 | -1,681 | 0,093 |
| T1xT4                                          | 379,0 | -2,117 | 0,034 | T3xT11 | 346,0 | -2,841 | 0,005 | T7xT11  | 470,0 | -1,500 | 0,134 |
| T1xT5                                          | 353,0 | -2,451 | 0,014 | T3xT12 | 260,0 | -4,012 | 0,000 | T7xT12  | 425,0 | -2,197 | 0,028 |
| T1xT6                                          | 484,0 | -1,332 | 0,183 | T4xT5  | 484,0 | -0,376 | 0,707 | T8xT9   | 539,0 | -0,013 | 0,990 |
| T1xT7                                          | 432,0 | -1,791 | 0,073 | T4xT6  | 535,0 | -0,314 | 0,754 | T8xT10  | 394,0 | -1,390 | 0,165 |
| T1xT8                                          | 431,0 | -1,063 | 0,288 | T4xT7  | 499,0 | -0,577 | 0,564 | T8xT11  | 448,0 | -1,013 | 0,311 |
| T1xT9                                          | 531,0 | -0,952 | 0,341 | T4xT8  | 475,0 | -0,070 | 0,944 | T8xT12  | 420,0 | -1,545 | 0,122 |
| T1xT10                                         | 537,0 | -0,301 | 0,763 | T4xT9  | 561,0 | -0,184 | 0,854 | T9xT10  | 515,0 | -0,949 | 0,343 |
| T1xT11                                         | 522,0 | -0,876 | 0,381 | T4xT10 | 351,0 | -2,323 | 0,020 | T9xT11  | 570,0 | -0,690 | 0,490 |
| T1xT12                                         | 536,0 | -0,893 | 0,372 | T4xT11 | 442,0 | -1,481 | 0,139 | T9xT12  | 531,0 | -1,318 | 0,188 |
| T2xT3                                          | 455,0 | -0,958 | 0,338 | T4xT12 | 325,0 | -3,084 | 0,002 | T10xT11 | 502,0 | -0,926 | 0,354 |
| T2xT4                                          | 479,0 | -0,443 | 0,658 | T5xT6  | 550,0 | -0,126 | 0,900 | T10xT12 | 470,0 | -1,490 | 0,136 |
| T2xT5                                          | 498,0 | -0,188 | 0,851 | T5xT7  | 517,0 | -0,346 | 0,729 | T11xT12 | 459,0 | -1,967 | 0,049 |

#### 11.4. Anexo 4

Tabela 13. Descrição de média ( $\pm$  erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, por tratamentos alimentares. Tmín-claro, tratamento baseado na mínima atividade proteolítica da fase de claro. Tmáx-claro, tratamento baseado na máxima atividade proteolítica da fase de claro.

| Tratamento                     |   | Categorias Comportamentais |                   |                   |                   |                   |                   |
|--------------------------------|---|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                                |   | Parado                     | Exploração        | Ingestão          | Enterram.         | Natação           | Rastejam.         |
| (Tmín-claro)                   |   | 2,881 $\pm$ 0,212          | 4,688 $\pm$ 0,211 | 4,640 $\pm$ 0,282 | 1,033 $\pm$ 0,166 | 1,606 $\pm$ 0,118 | 0,160 $\pm$ 0,023 |
| (Tmáx-claro)                   |   | 3,217 $\pm$ 0,227          | 3,538 $\pm$ 0,189 | 6,043 $\pm$ 0,333 | 0,702 $\pm$ 0,152 | 1,213 $\pm$ 0,103 | 0,287 $\pm$ 0,032 |
| Mann-Whitney entre tratamentos | U | 90264,5                    | 85111,5           | 87922,5           | 91663,5           | 89822,0           | 87871,5           |
|                                | Z | -1,652                     | -2,940            | -2,352            | -2,386            | -1,792            | -3,468            |
|                                | p | 0,099                      | 0,003             | 0,019             | 0,017             | 0,073             | 0,001             |

Tabela 14. Descrição de média ( $\pm$  erro padrão) da frequência de registros dos comportamentos parado, exploração, ingestão de alimento, enterramento, natação e rastejamento de *L. vannamei*, por tratamentos alimentares. Tmín-escuro, tratamento baseado na mínima atividade proteolítica da fase de escuro. Tmáx-escuro, tratamento baseado na mínima atividade proteolítica da fase de escuro.

| Tratamento                        |   | Categorias Comportamentais |                      |                      |                      |                      |                      |
|-----------------------------------|---|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                                   |   | Parado                     | Exploração           | Ingestão             | Enterram.            | Natação              | Rastejam.            |
| (Tmín-escuro)                     |   | 2,882 $\pm$<br>0,240       | 4,898 $\pm$<br>0,230 | 5,032 $\pm$<br>0,337 | 0,000 $\pm$<br>0,000 | 2,025 $\pm$<br>0,158 | 0,191 $\pm$<br>0,030 |
| (Tmáx-escuro)                     |   | 1,829 $\pm$<br>0,166       | 5,189 $\pm$<br>0,223 | 5,253 $\pm$<br>0,322 | 0,113 $\pm$<br>0,061 | 2,297 $\pm$<br>0,143 | 0,318 $\pm$<br>0,049 |
| Mann-Whitney<br>entre tratamentos | U | 51556,0                    | 57906,0              | 59015,5              | 59032,0              | 55142,0              | 57484,0              |
|                                   | Z | -3,338                     | -0,671               | -0,264               | -1,822               | -1,777               | -1,286               |
|                                   | p | 0,001                      | 0,502                | 0,792                | 0,068                | 0,076                | 0,199                |