

BRUNA CÁRITAS SOUZA DO VALLE FERREIRA

**APLICAÇÃO DE UM BIOPRODUTO COMPOSTO POR BIOFLOCO E LEVEDURA NA
NUTRIÇÃO DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei***

RECIFE

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

APLICAÇÃO DE UM BIOPRODUTO COMPOSTO POR BIOFLOCO E LEVEDURA NA NUTRIÇÃO DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*

BRUNA CARITAS SOUZA DO VALLE FERREIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título Doutora.

Profª Drª Roberta Soares

Orientadora

Recife

Janeiro/2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

V181a Valle, Bruna Cáritas Souza Ferreira
Aplicação de um bioproduto composto por biofloco e
levedura na nutrição do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* /
Bruna Cáritas Souza do Valle Ferreira. – Recife, 2018.
80 f.: il.

Orientadora: Roberta Borda Soares.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura, Recife, BR-PE, 2018.
Inclui referências.

1. Resíduo 2. Alimento proteico 3. Farinha de peixe
4. *Saccharomyces cerevisiae* 5. Desempenho zootécnico
6. Digestibilidade I. Soares, Roberta Borda, orient. II. Título

CDD 639

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA**

**APLICAÇÃO DE UM BIOPRODUTO COMPOSTO POR BIOFLOCO E LEVEDURA NA
NUTRIÇÃO DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei***

BRUNA CÁRITAS SOUZA DO VALLE FERREIRA

Tese julgada adequada para obtenção do título de doutora em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e aprovada em 11 de Janeiro de 2018 pela seguinte Banca Examinadora:

Profa. Dra. Roberta Borda Soares (Orientadora)
Departamento de Pesca e Aquicultura-UFRPE

Prof. Dr. Alfredo de Olivera Gálvez (Membro interno)
Departamento de Pesca e Aquicultura-UFRPE

Prof. Dr. Paulo Roberto Campagnoli Oliveira Filho (Membro interno)
Departamento de Pesca e Aquicultura-UFRPE

Profa. Dra. Juliana Ferreira dos Santos (Membro externo)
Unidade Acadêmica de Serra Talhada -UFRPE

Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos (Membro externo)
Departamento de Oceanografia- UFPE

Prof. Dr. Emanuell Felipe Beserra da Silva (Membro suplente)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba - IFPB

Prof. Dr. Luis Otávio Brito da Silva (Membro suplente)
Departamento de Pesca e Aquicultura-UFRPE

Dedicatória

*A todos aqueles que fizeram este trabalho possível. A toda equipe tão empenhada do Laboratório de Tecnologia em Aquicultura – LTA, representados aqui por **Camila Brito, Roberta Nery Ferreira, Camila Barros, Karin Barbosa, Flávio Floro e Paloma França**. Ao meu esposo, **Luciano Santos**, por todo apoio, incentivo, paciência e cuidado.*

Agradecimentos

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e aos docentes do programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura (PPGRPAq) pelos ensinamentos e contribuição para a minha formação profissional.

Aos órgãos Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo financiamento do projeto, e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Dra. Roberta Soares pela orientação e confiança.

Aos membros da banca por se disporem a auxiliar na melhora da qualidade deste trabalho com suas sugestões.

Aos professores Roberta Soares e Silvio Peixoto pela acolhida no LTA.

Ao professor Pabyton Cadena pelo incentivo e orientação da patente produzida a partir desta pesquisa.

Aos professores Eudes Correia e Alfredo Gálvez pelo exemplo de docentes e de seres humanos que são. Agradeço por cada vez que se dispuseram a me auxiliar na minha vida acadêmica.

Aos amigos que a universidade me deu Camila Brito, Roberta Nery, Camila Barros, Karin Barbosa, Thaís Castelo-Branco, Emanuell Felipe, Nathália Calazans, Juliana Interaminense, Joana Vogeley, Fabiana Alves, Lays Moura, Regina Coeli, Fabiana Penalva et al.

A toda equipe do LTA que trabalhou pesado para a conclusão deste trabalho por noites, madrugadas, finais de semana e feriados: Camila Brito, Roberta Nery, Camila Barros, Karin Barbosa, Flávio Floro, Paloma França, Luís Guilherme, Gabriel, José Roberto, José Filipe, João Vitor, Rhayssa Daniela, Juliana Barbosa, Mariane Gomes, Slayton Gleyson e Alisson, minha gratidão eterna.

Aos integrantes antigos e atuais do LAPAQ, coordenado pelo professor Eudes Correia, por toda ajuda no decorrer dos experimentos desta tese. Em particular à Fabiana Penalva pela disposição em ajudar sempre que lhe recorri e Rafael Liano pela boa vontade sempre.

Ao professor Ronaldo Cavalli e equipe, em especial Leilane Gomes, Reginaldo Florêncio, Prof. Santiago Hamilton pelo empréstimo e/ou doação de equipamentos e estrutura para a realização deste trabalho.

A toda equipe que cuidada tão bem de nós e de nosso departamento: Dna Telma Pascoal, Lia Maracajá, Niara, Dna Linalva, Dna Tânia, Tamires, Jaqueline, Dna Eliane, Tia Zena, Vanelly, Seu Manoel, e demais.

Aos meus familiares. Meus pais Alfredo e Sonia do Valle, por todo apoio e amor dedicado; Aos meus irmãos Bruno e Breno do Valle; Sobrinhas e sobrinho (Alice, Giovanna, Brenda e Arthur) por alegrarem os meus dias mais puxados recarregando minhas baterias, amo muito vocês, família!

Ao meu esposo Luciano Santos que esteve comigo durante todo o processo de vida acadêmica, acompanhou cada dificuldade, cada barreira ultrapassada e participou de forma efetiva de cada pedacinho deste trabalho. - Muito grata, meu amor!

Resumo

O presente trabalho de tese trata do desenvolvimento de um bioproduto composto por farinha de biofloco e levedura e sua aplicação na alimentação do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* como ingrediente substituto à farinha de peixe. O primeiro capítulo avalia o desempenho zootécnico do camarão na fase pós-larval onde são aplicadas substituições graduais da farinha de peixe pelo bioproduto proposto em até 100%, sendo os tratamentos nomeados de BL0, BL10, BL50, BL70, BL90 e BL 100, o experimento contou ainda com um tratamento com ração comercial totalizando sete tratamentos com três repetições, cada. As dietas foram elaboradas com 40% de proteína bruta. Os resultados estatísticos indicaram que a ração BL70, com 70% de substituição, apresentou respostas de ganho de peso, peso final e taxa de crescimento específico equivalentes aos tratamentos com a ração controle (BL0) e a ração comercial. Isto indica que a aplicação do bioproduto em substituição à farinha de peixe pode ser feita em até 70% sem causar qualquer alteração negativa no crescimento e sobrevivência de pós-larvas do *L. vannamei*. O segundo capítulo desta tese avalia a digestibilidade das rações formuladas com o bioproduto também em substituição percentual crescente à farinha de peixe, desta vez para juvenis do *L. vannamei*, com os tratamentos nomeados de BL0, BL10, BL30, BL50, BL70 e BL100, este experimento contou também com um tratamento composto por ração comercial totalizando sete tratamentos com três repetições, cada. As rações foram formuladas com 35% de proteína bruta e contendo em sua composição o óxido de cromo (Cr_2O_3) como marcador inerte. A avaliação da digestibilidade das rações indicou que a digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS) foi melhor nas rações com até 50% de substituição da farinha de peixe pelo bioproduto quando comparadas com a ração comercial e equivalentes à ração controle. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a avaliação da digestibilidade da proteína bruta (CDAPB). A digestibilidade da energia (CDAEB) foi equivalente à ração controle nos tratamentos onde a substituição foi de até 70%. A digestibilidade dos aminoácidos (CDAAA) da ração BL100 foi mais alta, para a maioria dos aminoácidos quando comparada com a ração controle (BL0), com exceção da lisina, onde a ração BL50 foi superior. Para metionina, tirosina e aminoácidos totais, não houve diferença entre os tratamentos. Estes resultados indicam a possibilidade da substituição da farinha de peixe pelo bioproduto em até 50% sem que haja comprometimento na absorção dos nutrientes. O presente trabalho de tese gerou ainda uma patente de invenção depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial INPI, cujo número de identificação é BR 10 2017 022794 4 e tem como título “Ração para aquicultura contendo bioproduto composto por uma mistura de biofloco e levedura”, em processo de avaliação. A invenção trata do processo de formulação e produção da ração contendo o bioproduto.

Palavras-chave: Resíduo, Alimento proteico, Farinha de peixe, *Saccharomyces cerevisiae*, Desempenho zootécnico, Digestibilidade

Abstract

The present study aimed to develop a bioproduct composed of biofloc flour and yeast and use it as a substitute ingredient to fish meal in the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* feeding. The first chapter of this study evaluated the zootechnical performance of *L. vannamei* post larvae after gradual replacement of fishmeal by the proposed bioproduct up to 100%. Treatments were identified as BL0, BL10, BL50, BL70, BL90, BL 100 and a treatment with commercial ration totaling seven treatments with three replicates. Diets were prepared with 40% crude protein. As results, BL70 treatment, with 70% replacement, responses of weight gain, final weight and specific growth rate were equivalent to treatments with control group (BL0) and commercial rations. This indicates that the application of the bioproduct in substitution for fish meal can be made up to 70% without causing any negative change in the growth and survival of *L. vannamei* post larvae. The second chapter of this thesis evaluates the digestibility of formulated diets with the bioproduct also in increasing percentage replacement to fish meal, this time for *L. vannamei* juveniles, with the treatments BL0, BL10, BL30, BL50, BL70, BL100 and a treatment composed by commercial ration totalizing seven treatments with three replicates. The rations were formulated with 35% crude protein and containing in their composition chromium oxide (Cr_2O_3) as an inert marker. The evaluation of rations digestibility indicated that the apparent digestibility of dry matter (CDAMS) was better in rations with up to 50% of fish meal replacement by the bioproduct, compared to the commercial ration and equivalent to the control ration. No statistical difference were found between treatments for crude protein digestibility (CDAPB). The energy digestibility (CDAEB) was equivalent to the control ration in treatments up to 70% replacement. Amino acid digestibility (CDAAA) of BL100 ration was higher for most amino acids when compared to control group (BL0) ration, except for lysine, that was higher in BL50 ration. Methionine, tyrosine and total amino acids analysis, there were no difference between treatments. These results indicate the possibility of replacing fishmeal by the bioproduct by up to 50% without compromising the nutrients absorption. The present work has also generated a patent of invention deposited in the National Institute of Industrial Property INPI, whose identification number is BR 10 2017 022794 4 and is entitled "Ração para aquicultura contendo bioproduto composto por uma mistura de bioflocos e levedura", in evaluation process. The invention relates to the process of formulation and production of the feed containing the bioproduct.

Key words: Biofloc, *Saccharomyces cerevisiae*, residue, zootechnical performance, digestibility

Lista de tabelas

Página

Capítulo I

Tabela 1. Composição proximal, aminoácidos e ácidos graxos dos principais ingredientes (g/kg).....	25
Tabela 2. Formulação das rações experimentais contendo o bioproduto de biofloco e levedura em substituição gradual à farinha de peixe (g/kg).....	26
Tabela3. Aminoácidos e ácidos graxos das rações experimentais contendo o bioproduto de biofloco e levedura (g/Kg).....	27
Tabela 4. Valores médios ($\pm$ DP) do desempenho zootécnico de pós-larvas de <i>L. vannamei</i> alimentadas com rações formuladas com o bioproduto.....	29

CapítuloII

Tabela1. Análise proximal, aminoácidos e ácidos graxos dos principais ingredientes (g kg^{-1}).....	62
Tabela 2. Formulação e composição proximal das rações experimentais (g kg^{-1}) produzidas com o bioproduto em substituição à farinha de peixe.....	63
Tabela3. Aminoácidos e ácidos graxos das rações experimentais e níveis recomendados para juvenis do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> (g kg^{-1}).....	64
Tabela 5. Digestibilidade aparente dos nutrientes das rações experimentais e comercial ($\% \pm$ DP).....	65

Capítulo III (patente)

Tabela 1. Quantidade dos ingredientes utilizadas na produção das rações contendo o bioproduto, tendo como controle a ração BL0.....	76
---	----

Sumário

Página

Dedicatória

Agradecimento

Resumo.....VI

Abstract.....VIII

Lista de tabelas.....IX

Sumário.....X

1- Introdução.....11

2- Referência Bibliográfica.....14

3- Artigos científicos.....17

3.1- Capítulo I - Bioproducto composto por biofloco e levedura como ingrediente de rações
para pós-larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*17

3.2- Capítulo II - Digestibilidade aparente de rações produzidas com um bioproducto
composto por biofloco e levedura em substituição à farinha de peixe para juvenis do camarão
marinho *Litopenaeus vannamei*.....42

4- Patente.....66

4,1- Capítulo III (Patente) - Ração para aquicultura contendo bioproducto composto por uma
mistura de biofloco e levedura.....66

5- Considerações finais.....80

1-Introdução

As atividades de pesca e aquicultura são importantes fontes de trabalho e alimento para milhões de pessoas em todo mundo. O consumo de pescado pela população cresce ao longo dos anos, dada preocupação com uma melhor qualidade de vida. Segundo dados da FAO (2016), o fornecimento de pescado para o consumo humano é duas vezes maior do que o crescimento populacional nos últimos 50 anos, com um ritmo anual médio de 3,2% entre 1961 e 2013.

Investimentos no setor da aquicultura seguem numa crescente, visto que a produção pela pesca de captura, estancada devido a eventos climáticos e sobrepesca, não é suficiente para manter a demanda da população por pescado. Em contrapartida, os custos com a produção aquícola são elevados, a depender do tipo de empreendimento. Estima-se que cerca 60% dos gastos com a produção estejam relacionados com a alimentação (QUINTERO, 2010) devido ao elevado custo do principal insumo utilizado na produção de rações para este setor.

A farinha e óleo de peixe são considerados os ingredientes mais nutritivos e digeríveis dentre os alimentos para os organismos aquáticos cultivados. No entanto, o elevado custo atribuído à escassez destes produtos resulta na clara diminuição do uso destes insumos, sendo portanto aplicados de forma mais seletiva (FAO, 2016). Uma queda expressiva da aplicação da farinha de peixe na alimentação de espécies aquícolas também é reportada por Tacon e Metian (2008). Encontrar ingredientes que possam reduzir ou substituir a farinha de peixe é uma tarefa já aplicada em algumas pesquisas com outros ingredientes de origem animal (PANINI et al., 2017); vegetal, com número mais expressivo de trabalhos (HASSAANA et al., 2017; HUANG et al., 2017; LIANG et al., 2017; MORENO-ARIAS et al., 2018), ou mesmo residual (ACHUPALLAS et al., 2016; VALLE, et al., 2016), com o compromisso de manter o padrão nutricional dentro dos cultivos.

Como mencionado, uma gama de ingredientes são propostos na busca de substituintes da farinha de peixe e dentre os potenciais ingredientes residuais está a aplicação do bioflocos. Esta iniciativa vem como contribuição na manutenção de uma atividade sustentável na medida em que se transforma um resíduo, que se descartado no ambiente implicaria em problemas no ecossistema, em alimento para o próprio setor.

Os primeiros ensaios de cultivos em sistema BFT (Biofloc Technology) surgiram na década de 1970 e foi sendo aperfeiçoado neste mesmo período com a inclusão de bactérias nitrificantes (EMERENCIANO et al., 2011, 2013). Com a intenção de se criar um ambiente onde fosse possível o cultivo em altas densidades, sem a necessidade de trocas de água (recurso escasso em muitas

localidades) e preservando a sanidade nos cultivos, por ser um sistema do tipo fechado, o BFT ganhou cada vez mais força. O bioflocos gerado nestes sistemas de cultivo consiste de um agregado de nutrientes composto por diversos microrganismos incluindo, além de fito e zooplâncton, bactérias que trabalham na ciclagem de compostos nitrogenados mantendo a qualidade da água no sistema (AVNIMELECH, 2009). Além disso, o bioflocos pode conter ainda resíduos da ração aplicada no cultivo, fezes dos organismos cultivados, entre outros. A junção de todos os compostos, orgânicos e inorgânicos, que compõem o bioflocos o torna um produto possível de ser aproveitado na alimentação tanto no próprio sistema de cultivo quanto empregado nas rações em forma de ingrediente proteico.

Diferentes organismos, a depender de parâmetros como salinidade, temperatura, luminosidade, fonte de carbono, entre outros, podem compor o bioflocos. Consequentemente seu conteúdo nutricional também poderá variar, sendo relatados pela literatura teores proteicos entre 12 e 49% (SOARES et al., 2004; KUHN et al., 2009). Tal variação dificulta a composição de rações com este produto. Dantas et al. (2016) ao trabalhar com a farinha de bioflocos (FB) em substituição à farinha de peixe (FP) esbarrou com esta problemática e, em sua formulação, só foi possível aplicar a FB em substituição à FP em até 30% visto que o conteúdo proteico da FB em seu experimento era de 24%.

A utilização de ingredientes aditivos para solução de alguma deficiência na alimentação de organismos cultivados é bastante aplicada. Para tentar sanar a deficiência proteica do bioflocos o presente estudo propôs a associação do bioflocos à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada tanto na nutrição humana quanto animal.

Leveduras são fungos unicelulares, com tamanhos e tipos variados com reprodução que pode ser sexuada, assexuada, por brotamento ou cissiparidade. São microrganismos cosmopolitas e, por este motivo, facilmente encontradas em diversos tipos de substratos como solo, na superfície de folhas e frutos e no trato gastrointestinal dos animais tendo como principal fonte de nutriente o carboidrato (PANDEY, 2001; HISANO, 2005). Dentre as leveduras mais estudadas destaca-se o gênero *Saccharomyces*, e sua principal espécie, a *Saccharomyces cerevisiae* que ao longo de milênios vêm sendo aplicadas na fabricação de alimentos no processo de fermentação de vinhos, cervejas e pães.

As leveduras têm alto valor proteico, são ricas em vitaminas do complexo B, que auxiliam em diversos aspectos da saúde animal, e uma composição de minerais adequada aos camarões (GARCÍA-GALANO, 2007; NRC, 2011). Além disto, são microrganismos de elevada digestibilidade chegando a um coeficiente de 87%, a depender da espécie (GARCÍA-GALANO,

2007). São importantes fontes de obtenção de nucleotídeos devido ao seu elevado conteúdo de ácidos nucleicos e os β -glucanos presentes em sua parede celular são bastante empregados em pesquisas para aquicultura como imunoestimulantes (GARCIA-GALANO, 2007; BAI et al., 2014). Vitaminas, enzimas e compostos como glucanas e mananas, combinadas aos demais ingredientes, conferem alta disponibilidade e valor biológico ao alimento (HISANO et al., 2004). As leveduras apresentam importantes propriedades funcionais que as torna excelentes fontes alternativas de nutrientes (HISANO et al., 2004, 2005; LI e GATLIN-III, 2003, 2004). Trabalhos com a aplicação de levedura na alimentação de peixes e camarões indicam resultados positivos em termos de crescimento, sobrevivência e imunidade associados ao consumo da levedura por estes organismos (LI e GLATIN 2003, 2004; SCHOLZ et al., 1999).

A proposta de um bioproduto composto por bioflocos e levedura possibilita substituições maiores que as aplicadas por Dantas (2016) devido à inclusão da levedura, que eleva os níveis proteicos e de aminoácidos da farinha de bioflocos. O termo bioproduto ainda não tem um consenso quanto a sua definição, porém de acordo com a Agriculture and agriculture Canada (2003), bioprodutos são novos produtos desenvolvidos a partir de organismos vivos e/ou partes constituintes destes que podem substituir ou elevar a produção de produtos de fontes não renováveis. Pode ser definido também como qualquer produto derivado ou gerado a partir de biomassa (COUTINHO e BONTEMPO, 2011).

Novos ingredientes quando aplicados à alimentação necessitam de uma série de investigações como aceitação; desempenho zootécnico dos animais, que vai apontar algumas respostas relacionadas ao crescimento; digestibilidade que indicará o potencial digerível do alimento, entre outros. Rações com elevada digestibilidade são, particularmente, importantes para aquicultura, pois além de disponibilizar uma maior quantidade de nutrientes para absorção reduz a problemática da qualidade de água nos cultivos. Rações com baixa digestibilidade proteica impactam na concentração de compostos nitrogenados na água que, conforme se elevam podem causar mortalidade dos animais cultivados.

Assim, o presente estudo tem como finalidade avaliar o desempenho zootécnico de pós-larvas do camarão *L.vannamei* alimentadas com rações produzidas com um bioproduto composto por bioflocos e levedura em substituição à farinha de peixe e a digestibilidade das rações produzidas com o bioproduto para juvenis da referida espécie.

2- Referências Bibliográficas

- ACHUPALLAS, J.M.; ZHOU, Y.; DAVIS, D.A. Pond production of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed grain distillers dried yeast. **Aquaculture Nutrition**, v.22, p. 1222-1229, 2016.
- AVNIMELECH, Y. Biofloc Technology - A Practical Guide Book. Baton Rouge, Louisiana, United States. The World Aquaculture Society. 2009.
- BAI, N.; GU, M.; ZHANG, W.; XU, W.; MAI, K. Effects of β -glucan derivatives on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against White spot syndrome virus infection. **Aquaculture**, v. 426-427, p. 66-73. 2014.
- DANTAS, E. M.; VALLE, B.C.S.; BRITO, C.M.S.; CALAZANS, N.K.F.; PEIXOTO, S.R.M.; SOARES, R.B. Partial replacement of fishmeal with biofloc meal in the diet of postlarvae of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**. v. 22, p. 335-342. 2016.
- EMERENCIANO, M.; CUZON, G.; GOGUENHEIM, J.; GAXIOLA, G.; AQUACOP. Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Aquaculture Research** (published online first DOI: 10.1111/j.1365-2109.2011.03012.x, 2011.
- EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G. and CUZON, G. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. In: Biomass Now – Cultivation and Utilization. INTECH. pp.301-328. 2013.
- FAO, 2016. The State of World Fisheries and Agriculture-2016
- GARCÍA-GALANO, T. Ingredientes procedentes de organismos unicelulares, In: GARCÍA-GALANO, T.; COLMENARES, H. V.; FENUCCI, J. L. (Eds). Manual de ingredientes proteicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos. Editora EUDEM, 1ª edição Mar del Plata, 2007. p 185-203.
- HASSAANA, M. S.; MAGDY, A. S.; ABDEL-MOEZC, A., M. Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Animal Feed Science and Technology**, v.201, p. 89-98, 2017.
- HISANO, H. Levedura desidratada íntegra, autolisada e componentes da parede celular como pró-nutrientes para a tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): Botucatu, SP: UNESP, 2005, p.90 (Doutorado em Zootecnia: Nutrição e Produção Animal) – Universidade Estadual Paulista. 2005.
- HUANG, F.; WANG, L.; ZHANG, C.; SONG, K. Replacement of fishmeal with soybean meal and mineral supplements in diets of *Litopenaeus vannamei* reared in low-salinity water. **Aquaculture**, v. 473, p. 172-180. 2017.

- KUHN, D.D.; BOARDMAN, G.D.; LAWRENCE, A.L.; MARSH, L.; FLICK, G.J. Microbial flocs generated in bioreactors is a superior replacement ingredient for fishmeal or soybean meal in shrimp feed. **Aquaculture**, v. 296, p.51–57. 2009.
- LI, P. and GATLIN III, D.M. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobionic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture**. v.231, p.445-456. 2004.
- LI, P., GATLIN III, D.M. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture**. v.219, p. 681-692. 2003.
- LIANG, X.F.; HU, L. ; DONG, Y.C.; WU, X.F.; QIN, Y.C.; ZHENG, Y.H.; SHI, D.D.; XU, M.; LIANG, X.F. Substitution of fish meal by fermented soybean meal affects the growth performance and flesh quality of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 229, p. 1-12, 2017.
- MORENO-ARIAS, A.; LÓPEZ-ELÍASA, J.A.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L.R.; RAMÍREZ-SUÁREZB, J.C.; CARVALLO-RUIZB, M.G.; GARCÍA-SÁNCHEZB, G.; LUGO-SÁNCHEZB, M.E.; MIRANDA-BAEZAC, A. Effect of fishmeal replacement with a vegetable protein mixture on the amino acid and fatty acid profiles of diets, biofloc and shrimp cultured in BFT system. **Aquaculture**, v.483, p. 53-62, 2018.
- NRC. National Research Council. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Research Council of the National Academies, Washington, 2011. 376p.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; LEON, J.R. Solid–state fermentation, biotechnology: Fundamentals and applications, 1st ed. Aristech Publishers. In: New Delhi, p. 221, 2001.
- PANINI, R.L.; FREITAS, L.E.L.; GUIMARÃES, A.M.; RIOS, C.; SILVA, M.F.O.; VIEIRA, F.N.; FRACALLOSSI, D.M.; SAMUELS, R.I.; PRUDÊNCIO, E. S.; SILVA, C. P., AMBONIA, R. D.M.C. Potential use of mealworms as an alternative protein source for Pacific white shrimp: Digestibility and performance. **Aquaculture**, v. 473, p.115-120, 2017.
- QUINTERO, H.E.; ROY, L.A. Practical feed management in semi-intensive systems for shrimp culture. In: ALDAY-SANZ, V. The shrimp book. Nottingham University Press, Nottingham, UK. 2010 p. 443–454.
- SCHOLZ, U.; GARCIA DIAZ, G.; RICQUE D.; CRUZ SUAREZ L. E.; VARGAS ALBORES, F.; LATCHFORD, J. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. **Aquaculture**. v. 176, p. 271-283. 1999.

SOARES, R.; JACKSON, C.; COMAN, F.; PRESTON, N. Nutritional composition of flocculated material in experimental zero-exchange system for *Penaeus monodon*. In: Proceedings of Australian Aquaculture, 2004, WAS, Sydney p.89.

TACON, A.G.J. and METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aqua-feeds: trends and future prospects. **Aquaculture**, v.285, p.146-158. 2008.

VALLE, B.C.S., DANTAS JR, E.M., SILVA, J.F.X., BEZERRA. R.S., CORREIA, E.S., PEIXOTO, S.R.M., SOARES, R.B. Replacement of fish meal by fish protein hydrolysate and biofloc in the diets of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 21, p. 105-112. 2015

3- Artigos científicos

3.1- Capítulo I

Bioproduto composto por biofloco e levedura como ingrediente de rações para pós-larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*

Artigo a ser submetido à revista *Animal Feed Science and Technology*
(ISSN: 0377-8401)

As normas de redação e citação deste capítulo atendem às exigências da referida revista, encontradas em: elsevier.com/journals/animal-feed-science-and-technology/0377-8401?generatepdf=true

Bioproduto composto por bioflocos e levedura como ingrediente de rações para pós-larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*

Bruna Cáritas Souza do Valle ^{*a}, Camila Brito^a, Camila Barros^a, Karin Barbosa^a, Flávio Guilherme^a,
Silvio Peixoto^a, Roberta Soares^a

^aUniversidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Laboratório de Tecnologia em Aquicultura, 52171-900, Recife, PE, Brasil *Corresponding author – contact information: e-mail: brunacaritas@hotmail.com

Resumo

O presente estudo propôs o uso da farinha de bioflocos combinada à levedura *Saccharomyces cerevisiae* como um bioproduto para inclusão em rações para a aquicultura em substituição à farinha de peixe. Para este trabalho foi utilizada a levedura *S. cerevisiae* ATCC 9763 cultivada em laboratório e a farinha de bioflocos (FB) produzida a partir do resíduo gerado em sistemas de cultivo do tipo BFT (Biofloc Technology). Estes produtos foram combinados em uma proporção de 9:1 (FB : levedura). Seis (06) rações experimentais com substituição gradual da farinha de peixe pelo bioproduto foram propostas para camarões na fase pós-larval. Houve ainda um tratamento com ração comercial atuando como controle externo perfazendo sete (07) tratamentos com três (03) repetições cada. Considerando uma ração basal com 400 g/kg de farinha de peixe (BL0) as demais rações acompanharam a substituição pelo bioproduto em 40 g/kg (BL10); 200 g/kg (BL50); 280 g/kg (BL70); 360 g/kg (BL90) e 400 g/kg (BL100). Os resultados estatísticos indicaram não haver diferença significativa entre os tratamentos para os parâmetros de ganho de peso, peso final, taxa de crescimento específico, conversão alimentar aparente e taxa de eficiência proteica. O tratamento BL100 apresentou resultados de sobrevivência superiores aos encontrados na ração controle enquanto que para biomassa final não houve diferença significativa entre os tratamentos BL90 (90% de substituição) e controle. Isto indica que a aplicação do bioproduto em substituição à farinha de

peixe pode ser feita em até 90% (360 g/kg) sem causar qualquer alteração negativa no crescimento, biomassa final e sobrevivência de pós-larvas do *L. vannamei*.

Palavras-chave

Alimento, Camarão, Peixe, *Saccharomyces cerevisiae*, Nutrição, Resíduo

1.Introdução

As fontes proteicas de origem marinha, sobretudo a farinha de peixe, são as mais utilizadas na produção de rações por terem excelente um perfil nutricional (aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais) e apresentarem elevada palatabilidade (Davis e Arnold, 2000; El-Sayed, 1999). No entanto, sua baixa oferta e crescente demanda indicam a necessidade da busca por outras fontes proteicas capazes de substituí-la e minimizar os gastos com a elaboração de rações, uma vez que o alimento ofertado responde por cerca de 40 a 70% dos custos totais de produção (Quintero e Roy, 2010). O consumo da farinha e óleo de peixe pela aquicultura segue uma tendência decrescente e o uso de substitutos da farinha de peixe em dietas é cada vez mais frequente (FAO, 2016). Dentre os ingredientes alternativos testados na aquicultura estão, além daqueles de origem vegetal, produtos de origem residual como os gerados em sistemas de cultivo intensivo do tipo BFT (Biofloc Technology) (Dantas Jr et al, 2016; Valle et al., 2015).

O bioflocos formado nos sistemas BFT é composto por organismos como fito e zooplâncton, bactérias, partículas orgânicas e inorgânicas e apresenta considerável conteúdo nutricional (Avnimelech, 2009). Comumente descartado quando atinge a capacidade máxima nos ambientes de cultivo, o bioflocos apresenta características para ser utilizado na produção de alimento para aquicultura. Entretanto, seu teor proteico médio de 270 g/kg (Emerenciano et al., 2012; Ju et al., 2008; Maicá et al., 2012; Wasielesky et al., 2006) reduz a possibilidade de substituição da farinha de peixe em níveis elevados, sugerindo a melhora no conteúdo nutricional deste produto para um maior aproveitamento em rações para a aquicultura.

Para suprir esta deficiência proteica o presente estudo indica o uso da levedura no enriquecimento da farinha de bioflocos visto que esta oferece uma série de benefícios, como elevado valor proteico (600-700 g/kg), vitaminas do complexo B, adequado balanceamento de aminoácidos e composição mineral para camarões e peixes, enzimas que auxiliam no processo digestivo, além de apresentar comprovada atividade probiótica (antibióticos naturais e estimulante de bactérias benéficas) (Araújo et al., 2009; Furuya et al., 2000; García-Galano et al., 2007; Hisano, 2005; Machado, 1997). A capacidade de se replicar com facilidade e ser um produto de baixo custo faz da levedura uma alternativa viável também em termos econômicos.

Dentre as leveduras mais estudadas está a do gênero *Saccharomyces*, destacando-se a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada pela indústria na fabricação de alimentos como o pão, o vinho e a cerveja. É um fungo unicelular, que se apresenta na forma de células elípticas, se reproduz por brotamento e é facilmente encontrada na natureza, apresentando a capacidade de se desenvolver de forma rápida em diversos tipos de substratos. Estudos realizados com peixes (Berto et al., 2016; Essa et al., 2011; Hassaan et al., 2015) e camarões (Gamboa-Delgado et al., 2016; Genc et al., 2007) consideram espécies de leveduras e seus derivados como promotores de crescimento e imunoestimulantes (Li e Gatlin, 2003, 2004; Scholz et al., 1999). Considerando estes fatores, o presente estudo tem como objetivo o desenvolvimento de uma ração produzida com um bioproduto composto por bioflocos e levedura em substituição à farinha de peixe que seja eficiente na nutrição de pós-larvas do camarão marinho *L.vannamei*.

2. Materiais e métodos

2.1 Ativação da levedura e determinação da concentração

A cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* INCQS 40002 (ATCC 9763), utilizada neste ensaio foi cedida pela Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro. A levedura foi ativada em 5mL de caldo YPD (Yeast Peptone Dextrose), composto de 1g/kg de extrato de levedura, 1g/kg de

75 peptona e 2g/kg de dextrose, e incubadas a 27°C por 48h. Posteriormente, 25µL da suspensão da
76 levedura foram inoculadas em placas de Petri contendo meio sólido YPD (diferenciado do caldo
77 YPD pela inclusão de 23 g/kg de ágar) e espalhada com o auxílio de alça de Drigalsky. As placas
78 foram incubadas em estufa de crescimento a 27°C por 72h. Posteriormente, uma (01) colônia
79 crescida foi suspensa em 10 mL de solução salina a 0,85% perfazendo a diluição 10⁻¹. Desta, foram
80 feitas diluições sucessivas e uma alíquota (100 µL) da diluição 10⁻⁴ foi plaqueada para a formação de
81 novas colônias. A partir destas foi construída uma curva que avaliou o perfil de concentração da
82 levedura de acordo com o número de colônias. Para isto, colônias com 3,5mm, em média, foram
83 selecionadas em quantidades crescentes, diluídas em solução salina estéril a 0,85% e lidas em
84 espectrofotômetro (HACH DR3900), utilizando o comprimento de onda de 625nm. Uma alíquota de
85 100µL de cada diluição lida no espectrofotômetro foi plaqueada em Ágar YPD e incubada a 27°C
86 por 72h. Posteriormente, as unidades formadoras de colônias (UFC/ mL) foram quantificadas e
87 comparadas com a leitura feita em espectro para conhecer a concentração da levedura utilizada.

88 2.2 Produção e secagem das leveduras

89 Para a produção de levedura em maior escala, foram estriadas colônias em placas contendo meio
90 YPD e incubadas em estufa de crescimento a 27°C por 72h. Após este período, as leveduras
91 crescidas nas placas foram transferidas para caldo YPD (duas placas/300mL de caldo), com
92 concentração inicial de 10⁷ UFC/mL. O caldo contendo as leveduras foi incubado em estufa a 27°C e
93 acompanhado através da leitura em espectrofotômetro. Assim que a concentração atingiu 10⁸
94 UFC/mL, concentração máxima alcançada nestas condições, o material foi centrifugado a 3000 rpm
95 por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o decantado suspenso em água destilada estéril para
96 remoção de resíduos do meio de cultura. O produto foi novamente centrifugado em mesma rotação e
97 tempo, o sobrenadante descartado e o concentrado de células foi congelado e posteriormente
98 submetido ao processo de liofilização. Para isto, a levedura foi disposta em placas de Petri cobertas
99 com filme plástico e mantida a -80°C por 24h. Após este período a levedura foi acondicionada no

100 liofilizador por igual período e após a eliminação da umidade foi macerada e peneirada em malha de
101 50µm.

102 A levedura foi então acondicionada em recipientes hermeticamente fechados a -8°C e uma
103 amostra enviada para análise de sua composição nutricional em laboratório comercial.

104 **2.3 Obtenção do biofloco e produção da farinha**

105 O biofloco utilizado foi coletado de cultivos de *L.vannamei* em sistema BFT desenvolvidos
106 em fazenda comercial. O desenvolvimento do biofloco foi acompanhado, através de coletas
107 periódicas da água de cultivo, utilizando cone de decantação Imhoff. Ao atingir um volume de
108 sólidos decantáveis acima de 20 mL/L, foi iniciada a coleta com auxílio de um sistema de decantação
109 montado ao lado dos tanques. O biofloco foi submetido a sucessivas filtrações em malhas de 250 e
110 50µm e filtro de celulose com porosidade de 10µm e o material obtido foi seco em estufa de
111 recirculação de ar forçada a 50°C. O produto seco foi triturado e peneirado até a obtenção de uma
112 farinha fina (50µm), armazenada em recipientes fechados, estocados a -8°C e avaliada a composição
113 nutricional em laboratório comercial.

114 **2.4 Bioproduto e rações experimentais**

115 Com os resultados das análises dos ingredientes, uma proporção de 9:1 de biofloco : levedura
116 foi estabelecida. Este padrão gerou um bioproduto (patente BR 10 2017 022794 4) que foi utilizado
117 na formulação das rações experimentais em substituição à farinha de peixe (400 g/kg na ração
118 controle). Esta relação utiliza o nível máximo de levedura recomendado para camarões (Hertrampf e
119 Piedad-Pascual, 2000) na ração experimental com maior presença do bioproduto.

120 Seis rações experimentais foram formuladas para apresentarem em sua composição 400 g/kg
121 de proteína bruta sendo elas isoproteicas e isoenergéticas (14,5 MJ/kg). As rações teste foram
122 elaboradas para camarões da espécie *L. vannamei* na fase de berçário.

As rações experimentais foram preparadas com ingredientes selecionados (Tabela 2), os quais foram previamente moídos e peneirados, quando necessário, em granulometria de 250µm. Os ingredientes foram misturados seguindo a sequência de secos e úmidos. A massa resultante foi seca em estufa de recirculação de ar a 50°C. A massa ainda levemente úmida foi pressionada em peneiras com abertura de malha de 0,85, 1,4 e 2mm para as granulometrias nos tamanhos desejados e voltou à estufa para término da secagem. As rações foram embaladas e mantidas a -20°C até seu envio para análise de composição nutricional.

As proporções de substituição da farinha de peixe pelo bioproduto nas rações foram de 0 a 100% sendo os tratamentos nomeados conforme a substituição. O tratamento BL0 (controle) consistiu da dieta basal sem a presença do bioproduto. Os demais tratamentos, BL10, BL50, BL70, BL90 e BL100 tiveram a substituição da farinha de peixe pelo bioproduto em 40, 200, 280, 360 e 400 g/kg, respectivamente.

2.5 Análises dos ingredientes

A análise de composição centesimal, aminoácidos e ácidos graxos da levedura, farinha de biofloco e rações foram realizadas em laboratório comercial utilizando os respectivos métodos: proteína bruta – método Dumas (Association of Oficial Analytical Chemists - AOAC, 2007); extrato etéreo - pelo método Soxhlet (Instituto Adolfo Lutz, 2005; AOAC, 1995); matéria mineral - técnica de incineração em mufla; umidade - umidade e voláteis (Instituto Adolfo Lutz, 1985); ácidos graxos -HPLC (AOAC, 2005) e aminoácidos -HPLC como derivados do PITC (White et al.,1986; Hagen et al., 1989).

2.6 Desenho experimental

O ensaio foi composto de sete (07) tratamentos com três (03) repetições cada. Destes, seis (06) tratamentos consistiram das rações formuladas e um (01) de uma ração comercial.

148 As pós-larvas de *L. vannamei* foram adquiridas em PL10 (10 dias em estágio pós-larval) de
149 uma larvicultura comercial. Os animais foram transferidos para o laboratório e aclimatados por dois
150 dias em um tanque de 310L, contendo água do mar filtrada (1 µm) e esterilizada com hipoclorito de
151 sódio (20 ppm). O tanque foi mantido sob aeração constante e com temperatura entre 25-26°C. Os
152 animais foram alimentados com dieta comercial própria para a fase de vida e náuplios de *Artêmia*
153 recém-eclodidos.

154 Tanques retangulares de polietileno, com volume útil de 50L, foram utilizados como
155 unidades experimentais. Estes foram interligados por um sistema de recirculação de água clara
156 contendo filtros biológico, mecânico e UV. Cento e cinquenta pós-larvas (PL12), com peso úmido
157 médio inicial de $0,00298 \pm 0,000439$ g foram estocados em cada unidade (3 PL/ L). Diariamente
158 foram avaliados os parâmetros de qualidade de água (temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido e
159 pH) e compostos nitrogenados (amônia e nitrito) para monitoramento de quaisquer alterações.

160 Os animais foram alimentados com as dietas experimentais considerando 80% da biomassa,
161 sendo esta quantidade ajustada conforme o crescimento. O alimento foi ofertado três vezes ao dia, às
162 08:00, 12:00 e 16:00h e o peso médio dos camarões foi verificado semanalmente.

163 Ao final de 30 dias, foram avaliados os parâmetros de desempenho zootécnico sendo eles:
164 peso final, ganho de peso ($GP = \text{peso final} - \text{peso inicial}$), conversão alimentar aparente ($CAA = \text{peso}$
165 $\text{seco do alimento ofertado (g)} / \text{ganho de peso (g)}$); taxa de crescimento específico ($TCE = 100 (\ln$
166 $\text{peso final} - \ln \text{peso inicial}) / \text{tempo}$); taxa de eficiência proteica ($TEP = (\text{ganho de peso/proteína}$
167 $\text{ofertada}) \times 100$); sobrevivência ($\text{Sobrevivência} = (\text{n}^\circ \text{ final. de camarões} / \text{n}^\circ \text{ de camarões estocados}) \times$
168 100) e biomassa final ($\text{Biomassa final} = \text{n}^\circ \text{ de indivíduos final} \times \text{peso médio final}$).

169 2.7 Análises estatísticas

Os parâmetros de qualidade da água e desempenho zootécnico foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade das variâncias (Cochran). Posteriormente, foram submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) e teste de diferenciação das médias (Duncan) pelo programa Statistica 7.0.

3. Resultados

3.1 Composição nutricional dos principais ingredientes

A composição nutricional dos ingredientes do bioproduto e da farinha de peixe, descritos na Tabela 1, mostra a proximidade na concentração de alguns importantes nutrientes da levedura e da farinha de peixe como proteína e aminoácidos, chegando a ser superior na levedura, em alguns casos. Os nutrientes das células de levedura apresentaram, em sua maioria, níveis superiores aos encontrados na farinha de biofloco, no entanto, ambos os ingredientes, tem em sua composição todos os aminoácidos essenciais.

Tabela 1. Composição proximal, aminoácidos e ácidos graxos dos principais ingredientes (g /kg) utilizados na elaboração das dietas experimentais.

	Farinha de peixe	Levedura ATCC 9763	Farinha de biofloco (FB)	Bioproduto
<i>Aminoácidos essenciais</i>				
Arginina	42,2	41,7	10,4	13,5
Fenilalanina	22,1	31	10,7	12,7
Histidina	19,6	18,18	3,3	4,8
Isoleucina	20,8	37	8,2	11,1
Leucina	41,5	8,9	15,6	14,9
Lisina	39,2	63,3	8,2	13,7
Metionina	17,4	11,76	2,7	3,6
Treonina	24,9	36,79	10	13,6
Valina	28,9	41,07	1,38	16,5
<i>Aminoácidos não essenciais</i>				
Ácido aspártico	57,6	85,35	11,9	19,24
Ácido glutâmico	84,8	93,9	21,6	28,83
Alanina	44,7	51,55	15,1	18,74
Glicina	72,1	35,51	15,6	17,59

Cistina	9,4	5,13	1,3	1,68
Prolina	38,7	30,37	10	12,04
Serina	29,4	46,63	10,1	13,75
Taurina	10,9	ND	0,1	0,09
Tirosina	17,2	27,16	7,2	9,2

Ácidos graxos

Gorduras Saturadas	16,89	2,4	3,85
Gorduras insaturadas	20,53	1,5	3,4
Gorduras Monoinsaturadas	19,89	1	2,89
Gorduras Poli-insaturadas	0,64	0,5	0,51

Análise proximal

Proteína bruta	719,8	712,7	247,1	279,4
Extrato etéreo	90,2	37,43	4	7,3
Cinzas	127,3	70	366	278,9
Umidade	94,2	20	86,3	79,7

ND- não detectado

Devido à predominância da farinha de biofloco na composição do bioproduto, este apresentou um teor proteico inferior ao da farinha de peixe. No entanto, a presença da levedura elevou a concentração de proteína e aminoácidos do produto final. Outra vantagem da presença da levedura na composição do bioproduto é a redução de cinzas. Considerando que a proporção de cinzas na levedura é inferior à encontrada na farinha de biofloco (FB) ao substituir 10g/kg da farinha de biofloco por levedura a concentração deste composto inorgânico reduz de 7- 8%.

3.2 Formulação e composição nutricional das rações

As rações formuladas acompanharam a substituição gradual da farinha de peixe pelo bioproduto até seu nível máximo com a ração BL100 (Tabela 2). A tabela apresenta ainda informações de composição nutricional da ração comercial indicada pelo fabricante. O conteúdo proteico nas rações formuladas ficou bem próximo ao estipulado na formulação (400 g/kg).

Tabela 2. Formulação das rações experimentais para *L. vannamei* contendo o bioproduto de biofloco e levedura em substituição gradual à farinha de peixe (g/kg)

<i>Ingredientes</i>	Tratamentos						COM ^a
	BL0	BL10	BL50	BL70	BL90	BL100	
Farinha de peixe	400	360	200	120	40	0	
Bioproduto	0	40	200	280	360	400	
Farelo de soja	90	90	170	190	215	215	
Farelo de trigo	120	120	110	60	60	60	
Farinha de trigo	200	200	100	70	60	60	
Farinha de vísceras de aves	70	70	100	150	150	150	
Farinha de camarão	40	40	50	60	60	60	
Gelatina	10	10	20	20	35	35	
Mix de vitaminas e minerais ^b	10	10	10	10	10	10	
Óleo de peixe	10	10	10	10	10	10	
Goma de mandioca	50	50	30	30	0	0	
<i>Análise proximal</i>							
Proteína bruta	412,7	410,7	403,4	402,1	401	395,8	400
Extrato etéreo	81,1	75,6	60,4	74,8	73,1	61,7	80
Cinzas	81,6	90,4	136,7	162	181,3	190,1	130
Umidade	63,3	75,6	98	78,3	77,3	77,7	130
Carboidratos totais ^c	424,6	423,3	399,5	361,1	344,6	464,8	
Energia bruta (MJ/Kg)	14,78	17,68	16,42	16,39	15,88	15,61	

^a Níveis mínimos de proteína e extrato etéreo e máximo de cinzas e umidade na ração estabelecidos pelo fabricante na ração comercial

^b Premix min. e vit. (Supremais, Campinas-SP): Composição por quilo de: Vit. A = 1.200.000 UI; vit. D3 = 200.000 UI; vit. E = 12.000 mg; vit. K3 = 2400 mg; vit. B1 = 4800 mg; vit. B2 = 4800 mg; vit. B6 = 4000 mg; vit. B12 = 4800 mg; ác. fólico = 1200 mg; pantotenato de cálcio = 12.000 mg; vit. C = 48.000 mg; biotina = 48 mg; colina = 65.000 mg; ácido nicotínico = 24.000 mg; Fe = 10.000 g; Cu = 600 mg; Mn = 4000 mg; Zn = 6000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg e Se = 20 mg.

^c Carboidratos totais = 100 - (PB + EE + Cinzas)

A tabela 3 apresenta os níveis de aminoácidos essenciais nas rações experimentais e indica os níveis recomendados para a espécie. Informa ainda os níveis dos aminoácidos não essenciais e ácidos graxos totais e essenciais.

Tabela 3. Composição de aminoácidos e ácidos graxos (g/Kg) das rações experimentais para *L. vannamei* contendo o bioproduto de biofloco e levedura em substituição a farinha de peixe.

<i>Aminoácidos essenciais</i>	Tratamentos						Níveis recomendados
	BL0	BL10	BL50	BL70	BL90	BL100	
Arginina	25,9	25,2	24,1	23,9	23,9	22,3	19 ^a
Fenilalanina	14,8	14,7	14,7	14,5	16	15,4	14 ^b
Histidina	10,5	11,3	10,4	9,8	9,4	9,2	8 ^b
Isoleucina	16,3	15,8	14,3	14	14,7	14,4	10 ^b

Leucina	27,7	27,3	25,7	25,3	25,1	24,6	17 ^b
Lisina	27,2	26,7	24,6	22,6	21,6	20,2	16 ^e
Metionina	8,9	8,6	7,1	6,1	6,2	5,3	9 ^c
Treonina	15,8	15,3	15,2	14,5	15	13,9	14 ^d
Valina	18,4	18	16,8	16,4	16,9	16	14 ^f

Aminoácidos não essenciais

Ácido aspártico	36,6	35,4	31,8	26,2	28,8	19,4	
Ácido glutâmico	57,9	57,8	53,2	49,5	48,9	41,7	
Alanina	24,3	23,4	22,8	22,2	22,5	22,3	
Cistina	5,3	5,8	4,6	3,6	5	4,3	
Glicina	36,1	34,2	32,2	30,2	31	28,6	
Prolina	24,8	23,9	22,7	22,2	22,2	21,2	
Serina	19	18,4	18	17,4	17,2	15,8	
Tirosina	12,7	12,6	11,5	10,2	11,3	10,9	

Ácidos graxos

Gorduras saturadas	14,4	13,7	12,3	16,7	17,7	15,4	
Gorduras insaturadas	66,7	61,9	48,1	58,1	55,4	46,3	
Gord.monoinsaturadas	20,8	19,3	15,8	20,2	20,3	17,6	
Gorduras polinsaturadas	45,9	42,6	32,3	37,9	35,1	28,7	
Ácido linoleico (18:2n-6)	22,8	21,9	18,4	23,3	23,8	20,6	12 ^g
Ácido linolênico (18:3n-3)	4,9	4,5	3,2	3,5	3	2,3	12 ^g
ARA (20:4n-6)	1,4	1,3	1,2	1,5	1,5	1,4	5 ^h
EPA (20:5n-3)	5,2	4,7	3	2,9	2,1	1,3	5 ^h
DHA (22:6n-3)	9,6	8,5	5,4	5,3	3,6	2,3	5 ^h

a Millamena et al. (1998)

b Millamena et al. (1999)

c Richard et al. (2010)

d Millamena et al. (1997)

e Fox et al. (1995)

f Teshima et al. (2002)

g Glencross and Smith (1999), para *P. monodon*

h González-Felix et al.(2003)

EPA= Ác. Eicosapentaenóico

DHA= Ác. Docosahexaenóico

3.3 Qualidade de água e desempenho dos animais

A temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido e o pH apresentaram médias ($\pm$ DP) de 30,15 $\pm$ 0,879°C; 31,27 $\pm$ 1,22 g/L; 5,25 $\pm$ 0,518 mg/ L e 7,12 $\pm$ 0,148, respectivamente. A média ($\pm$ DP) para amônia foi de 0,598 $\pm$ 0,561 mg /L e nitrito de 1,13 $\pm$ 0,761 mg/L.

Os valores médios ($\pm$ DP) de peso final (PF), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE%), conversão alimentar aparente (CAA) e taxa de eficiência proteica (TEP%) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios ($\pm$ DP) do desempenho zootécnico de pós-larvas de *L. vannamei* alimentadas com rações formuladas com o bioproduto de biofloco e levedura em substituição a farinha de peixe.

Trat.	PF	GP	TCE%	CAA	TEP%	SOBREV%	BF
BL0	0,3253 $\pm$ 0,031 ^a	0,3212 $\pm$ 0,031 ^a	15,62 $\pm$ 0,32 ^a	1,77 $\pm$ 0,22 ^a	138,02 $\pm$ 17,41 ^a	68,89 $\pm$ 19,4 ^b	33,9 $\pm$ 4,72 ^{ab}
BL10	0,3264 $\pm$ 0,042 ^a	0,3289 $\pm$ 0,042 ^a	15,68 $\pm$ 0,42 ^a	1,81 $\pm$ 0,22 ^a	135,12 $\pm$ 9,63 ^a	78,89 $\pm$ 13,8 ^{ab}	39,89 $\pm$ 2,54 ^a
BL50	0,2805 $\pm$ 0,053 ^a	0,2817 $\pm$ 0,053 ^a	15,14 $\pm$ 0,62 ^a	1,72 $\pm$ 0,22 ^a	146,03 $\pm$ 19,98 ^a	66,22 $\pm$ 12,9 ^b	28,62 $\pm$ 6,76 ^b
BL70	0,2981 $\pm$ 0,088 ^a	0,2973 $\pm$ 0,088 ^a	15,24 $\pm$ 1,03 ^a	1,69 $\pm$ 0,09 ^a	147,72 $\pm$ 7,71 ^a	79,55 $\pm$ 25,93 ^{ab}	33,91 $\pm$ 5,89 ^{ab}
BL90	0,2247 $\pm$ 0,037 ^a	0,2219 $\pm$ 0,037 ^a	14,37 $\pm$ 0,59 ^a	1,70 $\pm$ 0,14 ^a	147,11 $\pm$ 12,44 ^a	86,89 $\pm$ 10,6 ^{ab}	29,38 $\pm$ 7,81 ^{ab}
BL100	0,194 $\pm$ 0,037 ^a	0,1907 $\pm$ 0,037 ^a	13,86 $\pm$ 0,63 ^a	1,84 $\pm$ 0,14 ^a	137,72 $\pm$ 10,19 ^a	92,44 $\pm$ 4,73 ^a	26,93 $\pm$ 4,363 ^b
COM*	0,2772 $\pm$ 0,049	0,2724 $\pm$ 0,049	15,03 $\pm$ 0,67	2,44 $\pm$ 0,45	104,63 $\pm$ 18,14	57,55 $\pm$ 3,05	23,40 $\pm$ 2,80

*COM= Tratamento com ração comercial (os dados de desempenho da ração comercial não foram utilizados para comparação estatística entre os tratamentos)

PF= Peso final; GP= Ganho de peso; TCE%= Taxa de crescimento específico (%); CAA= Conversão alimentar aparente; TEP%= Taxa de eficiência proteica (%); SOBREV%= Sobrevivência (%); BF= Biomassa final

A taxa média de sobrevivência mais elevada foi observada no tratamento BL100 (400g/kg do bioproduto) diferenciando significativamente dos tratamentos controle e BL50. Já os dados de biomassa final indicam não haver diferença significativa entre o tratamento com maior substituição (BL100) e controle. No entanto, se avaliados apenas os tratamentos com a presença do bioproduto a indicação de uso passa a ser de 90% de substituição (360g/kg do bioproduto) para este parâmetro.

Embora não tenha sido aplicado o tratamento com ração comercial na avaliação estatística, os valores médios indicam melhores resultados em termos de crescimento (PF, GP e TCE%) para as rações com até 70% de substituição (280 g/kg) quando comparadas com a ração comercial. Para conversão alimentar aparente (CAA) e taxa de eficiência proteica (TEP) os resultados obtidos com as rações experimentais foram melhores do que os encontrados na ração comercial. O mesmo pode ser observado para biomassa final e sobrevivência onde os resultados deste segundo são 38% maior do que na ração comercial.

4.Discussão

Ingredientes do bioproduto

A “levedura de cerveja” utilizada como aditivo na produção de rações tem em sua composição, além da levedura *S. cerevisiae*, grãos utilizados na produção da cerveja gerando um produto com teor proteico entre 270 e 426 g/kg (Lim et al., 2008; NRC, 2011). No presente estudo a levedura utilizada para o bioproduto foi composta apenas por células da *S. cerevisiae* com 712,7 g/kg de proteína bruta. Este fator permitiu gerar um bioproduto capaz de ser utilizado em substituições maiores às aplicadas por Dantas et al. (2016), que limitou o uso da farinha de biofloco em substituição da farinha de peixe em 120 g/kg (30%) devido à deficiência proteica e de aminoácidos encontrada no biofloco. A farinha de biofloco empregada no bioproduto apresentou nível proteico (247,1 g/kg) dentro da faixa de valores observados por outros autores, que pode estar entre 233,9 a 511,9 g/kg (Bauer et al, 2012; Pérez-Fuentes et al, 2013). Estas variações estão diretamente relacionadas à sua composição, considerando, principalmente, os microrganismos presentes.

Os níveis de lipídios encontrados na levedura neste estudo (17,5 g/kg) estão dentro da faixa descrita por outros autores para a mesma espécie, variando de 8g/kg a 30,44g/kg (NRC, 2011; Sgarbieri, 1999; Tacon, 1989). Para o biofloco, esta quantidade foi de 40 g/kg, teor que se mostra equivalente aos níveis encontrados também por outros autores (Azim e Little, 2008; Avnimelech, 2009; Crab et al., 2010). Ambos os ingredientes do bioproduto apresentaram teores lipídicos inferiores ao da farinha de peixe utilizada (Tabela 1). No entanto, este fator pode ser equilibrado com o aumento de outras fontes lipídicas como óleos vegetais.

Dietas experimentais

A formulação das rações seguiu as necessidades da espécie para a fase de pós-larva. Kanazawa (1990) recomenda para larvas de peneídeos de 230 a 570 g/kg de proteína, nível encontrado na composição das rações experimentais. Já os aminoácidos essenciais (AA) estiveram acima do recomendado para a espécie, inclusive a lisina, considerada um aminoácido limitante. No

274 entanto a metionina decresceu conforme o aumento na substituição da farinha de peixe pelo
275 bioproduto. Este fator está relacionado à baixa concentração deste aminoácido na farinha de
276 biofloco. Tanto a lisina quanto a metionina são aminoácidos indispensáveis à boa manutenção e
277 crescimento dos camarões (Millamena et al. 1999). Embora tenha apresentado níveis abaixo do
278 recomendado nas maiores substituições, este fator não interferiu no desempenho dos camarões
279 cultivados. A deficiência observada para a metionina pode ser solucionada com a suplementação do
280 aminoácido sintético na ração (DL-metionina).

281 Os teores de lipídeos também se mantiveram dentro do que é indicado para a espécie. Embora
282 não haja uma necessidade lipídica definida para camarões peneídeos, os níveis irão variar de acordo
283 com a fase de vida, espécie, hábito alimentar e fisiologia. Assim, recomenda-se a adição entre 50 e
284 80 g/kg de lipídeos em rações comerciais (Gonzalez-Félix et al, 2002, Holme et al. 2009; NRC,
285 2011). Rações com 80 g/kg de lipídeos são mais palatáveis (Fitzsommons, 2001) enquanto níveis
286 excedendo 100 g/kg estão associados ao retardo do crescimento e aumento da mortalidade dos
287 indivíduos (Kanazawa et al., 1977; Sheen e D'Abramo, 1991, NRC, 2011).

288 Considerando que a farinha de peixe é um ingrediente rico em ácidos graxos polinsaturados
289 (PUFA) (Hertrampf and Piedad-Pascual, 2000), sua redução, conforme sua substituição pelo
290 bioproduto, evidenciou um decréscimo gradativo destes ácidos graxos nas rações. A concentração
291 dos ácidos graxos essenciais ARA, EPA, DHA (para alguns dos tratamentos) presentes nas rações
292 teste e os ácidos linoleico-18:2n-6 e linolênico-18:3n-3, não acompanharam a concentração
293 recomendada. Segundo Das (2006), a deficiência em ácidos graxos essenciais na dieta pode resultar
294 em graves patologias, baixo crescimento e morte do animal. Todos os ácidos graxos atuam como
295 fontes de energia para o desenvolvimento, crescimento, natação e reprodução (Sargent et al., 1989;
296 Tocher et al., 1985), mas, especificamente os LC-PUFA (ácidos graxos polinsaturados de cadeia
297 longa), têm um papel essencial no metabolismo do animal (Martins et al., 2006; NRC, 2011).

298 Embora o balanceamento dos ácidos graxos não tenha estado dentro do padrão recomendado, este
299 fator parece não ter interferido nas respostas de desempenho neste estudo.

300 Khatoon et al. (2017) ao testarem a substituição gradual (0, 250, 500, 750 e 1000 g/kg) de
301 uma ração comercial pela farinha de biofloco na alimentação de pós-larvas (PL1 a PL12) do *L.*
302 *vannamei*, observaram que o resultado de taxa de crescimento específico (TCE) da espécie foi
303 inferior no tratamento com substituição de 250 g/kg (concentração de FB encontrada na ração BL70
304 no presente estudo) quando comparado aos tratamentos com substituições maiores. O mesmo não é
305 relatado no presente estudo, visto que não houve diferença entre os tratamentos para o parâmetro de
306 taxa de crescimento específico (TCE). Estes autores relatam ainda o aumento das taxas de
307 sobrevivência nas rações com até 750 g/kg da farinha de biofloco em sua composição. O mesmo foi
308 observado no presente estudo onde a ração contendo o bioproduto em maior concentração obteve
309 resultados superiores ao tratamento controle. Estudos com a avaliação do desempenho de camarões
310 cultivados em sistema de bioflocos relatam o aumento nas taxas de crescimento e sobrevivência dos
311 indivíduos (Moss, 2001; Wasielesky et al, 2006). Este fator pode estar relacionado com a
312 composição do biofloco, o qual pode conter microrganismos probióticos que podem atuar no sistema
313 imune do animal melhorando as taxas de sobrevivência (Khatoon et al., (2017).

314 Vários estudos também demonstram que a aplicação da levedura suplementada na
315 alimentação de camarões resulta na melhoria dos parâmetros de crescimento animal (Genc et al.,
316 2007; Hisano et al 2008). No entanto, ao suplementarem a dieta do *L.vannamei* com diferentes
317 concentrações da levedura, Qiu e Davis (2017) não observaram diferença dos parâmetros de
318 crescimento quando adicionados até 40 g/kg da levedura, corroborando com o resultado encontrado
319 no presente estudo onde não foi observada diferença significativa entre os tratamentos contendo o
320 bioproduto com a levedura em sua composição mesmo no tratamento BL100 (com 40g/kg da
321 levedura). Igualmente, Chotikachinda et al. (2008), ao investigar os efeitos da inclusão de diferentes
322 concentrações da levedura inativa na dieta de juvenis do camarão *L. vannamei* não observaram

323 diferença no crescimento do animal, porém, alguns parâmetros de imunidade foram melhores em
324 camarões alimentados com dietas suplementadas com a levedura.

325 Pesquisas que comprovam a ação imunoestimulante da levedura são bastante difundidas.
326 Segundo Webster et al. (2008) três componentes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* podem ter
327 efeitos imunomoduladores, sendo eles: os beta-glucanos (presentes na parede celular da levedura),
328 que demonstraram aumentar as respostas imunes e a resistência a doenças em várias espécies
329 ativando a produção de hemócitos (Glatin, 2002); os nucleotídeos, que melhoram a resistência a
330 doenças; e a quitina, que é relatada como tendo efeitos imunoestimulantes. A maior taxa de
331 sobrevivência observada no tratamento BL100, em relação ao controle, é um indício da eficácia do
332 bioproduto também como um produto atuante na sanidade do animal, embora um estudo
333 aprofundado do bioproduto como ingrediente imunoestimulante precise ser realizado. Segundo
334 Hertrampf e Piedad-Pascual (2000), o uso de substâncias imunoestimulantes é particularmente
335 interessante no cultivo de camarões uma vez que a vacinação destes organismos em escala produtiva
336 é irreal e impraticável.

337 O bioproduto proposto neste estudo tem a intenção de dar destino ao resíduo dos cultivos
338 BFT, auxiliando na sustentabilidade da atividade aquícola. O mix do bioflocos com a levedura traz a
339 possibilidade de um produto com melhor conteúdo nutricional do que apenas o bioflocos, permitindo
340 maiores substituições da farinha de peixe do que as aplicadas em outros estudos (Valle et al., 2015,
341 Dantas et al., 2016).

342 **5.Conclusão**

343 Os resultados demonstraram a possibilidade de substituições de até 360 g/kg (90%) da farinha
344 de peixe pelo bioproduto composto por bioflocos e levedura sem que haja comprometimento no
345 desempenho da espécie avaliada.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Agradecimentos

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e apoio da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ que cedeu a levedura utilizada nesta pesquisa.

Referências bibliográficas

- AOAC, 1995. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists. Arlington. chapter 33. (method 920.39, C). p.10-1.
- AOAC, 2007. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18. Crude protein in meat and meat products including pet foods. Ed. rev. 2. Gaithersburg. 39. (method 992. 15). p. 6-7.
- AOAC. 2005 Official Methods of Analyses of the Association of Analytical Chemists. 18. ed., (method 996.06). p. 20-25.
- Araújo, L.F.; Dias, M.V.C.; Brito E.A.; Júnior, S.O., 2009. Enriquecimento proteico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal. Tecn. Ciênc. Agropec. 3, 47-53.
- Avnimelech, Y., 2009. Biofloc Technology - A Practical Guide Book. Baton Rouge, Louisiana, United States. The World Aquaculture Society.
- Azim, M. E., Little, D. C., 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture. 283. 1-4. 29-35.

- 370 Bauer, W., Prentice-Hernandez, C., Tesser, M.B., Wasielesky, W., Poersch, L.H.S., 2012.
371 Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the Pacific
372 white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 342-343. 112–116.
- 373 Berto, R.S., Pereira, G.V., Mouriño J.L.P., Martins, L.M., Fracalossi, D.M., 2016. Yeast extract on
374 growth, nutrient utilization and haemato immunological responses of Nile tilapia, Aquac. Research.
375 47. 1-11.
- 376 Chotikachinda R., Lapjatupon W., Chaisilapasung S., Sangsue D., Tantikitti C., 2008. Effect of
377 inactive yeast cell wall on growth performance, survival rate and immune parameters in Pacific
378 White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Songklanakarin J. Sci. Technol. 30. 687-692.
- 379 Crab, R., Chielens B., Wille M., Bossier P., Verstraete W., 2010. The effect of different carbon
380 sources on the nutritional value of bioflocs, a feed for *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae.
381 Aquaculture Research, v. 41, n. 4, p. 559-567.
- 382 Dantas, E. M., Valle, B.C.S., Brito, C.M.S., Calazans, N.K.F., Peixoto, S.R.M., Soares, R.B., 2016.
383 Partial replacement of fishmeal with biofloc meal in the diet of postlarvae of the Pacific white
384 shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquac. Nutrition. 22. 335-342.
- 385 Das, U. N., 2006. Essential fatty acids – a review. Curr. Pharm. Biotechnology. 7. 467-482.
- 386 Davis, D.A. Arnold, C.R., 2000. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white
387 shrimp. *Litopennaeus vannamei*. Aquaculture. 235. 291-298.
- 388 El-Sayed, A.-F.M., 1999. Alternative dietary protein for farmed tilapia, *Oreochromis* spp.
389 Aquaculture. 179. 149-168.
- 390 Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M., Gaxiola, G. 2012. Biofloc technology applied to intensive
391 broodstock farming of pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Part II): spawning performance,
392 biochemical composition and fatty acid profile. Aquac Res. (submitted)

- 393 Essa M.A.; Mabrouk H.A.; Mohamed R.A.; Michael F.R., 2011. Evaluating different additive levels
394 of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, on the growth and production performances of a hybrid of two
395 populations of Egyptian African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*. 320. 137–141.
- 396 FAO, 2016. The state of world fisheries and aquaculture, 2016.
- 397 Fitzsimmons, K., 2001. Polyculture of tilapia and penaeid shrimp. *Global Aquaculture Advocate*,
398 v.4, n.3, p.43-44. Disponível em: <http://www.gaalliance.org/> acesso em: agosto 2017
- 399 Fox, J.M., Lawrance, A.L., Li-Chan, E. 1995. Dietary requirements for Lysine by juvenile *Penaeus*
400 *vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture*, 131, 279-290.
- 401 Furuya, W.M.; Seron, S.; Vargas, L. 2000. Níveis de levedura desidratada spray dried na dieta de
402 alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ciência Rural*, v.30, n.4, p. 699-704.
- 403 Gamboa-Delgado, J., Fernández-Díaz, B., Nieto-López, M., Cruz-Suárez, L.E., 2016. Nutritional
404 contribution of torula yeast and fish meal to the growth of shrimp *Litopenaeus vannamei* as indicated
405 by natural nitrogen stable isotopes. *Aquaculture*. 453. 116-121.
- 406 García-Galano T., 2007. Ingredientes procedentes de organismos unicelulares, in: García-Galano T.,
407 Colmenares H. V., Fenucci J. L. (Eds). *Manual de ingredientes proteicos y aditivos empleados en la*
408 *formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos*. Editora EUDEM, 1ª edição Mar del
409 Plata. pp 185-203.
- 410 Genc, M.A., Aktas, M., Genc, E., Yilmaz, E., 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharide on
411 growth, body Composition and hepatopancreas histology of *Penaeus Semisulcatus* (de haan 1844).
412 *Aquaculture Nutrition*. 13. 156-161.
- 413 Glencross, B. and Smith D.M. 1999. The linoleic and linolenic acids requirements of the prawn,
414 *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition*, 5,. 53-64.
- 415 González-Félix, M.L., Gatlin III, D.M., Lawrence, A.L., Pérez-Velazquez. 2003. Nutritional
416 evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *litopenaeus vannamei*: II. Effect of dietary n-

- 417 3 and n-6 polyunsaturated and highly unsaturated fatty acids on juvenile shrimp growth, survival, and
418 fatty acid composition. *Aquaculture Nutrition*, 9, 115-122.
- 419 González-Félix, M.L., Lawrence, A. L., Gatlin, D. M., Perez-Velazquez, M., 2002. Growth, Survival
420 and fatty acid composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* fed different oils in the presence and
421 absence of phospholipids. *Aquaculture*, v.205, p. 325-343.
- 422 Hagen, S.R., Frost, B., Augustin, J., 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-
423 chromatography of amino-acids in food. *J. Assoc. Offi. Ana. Chemists*. 72 (6). 912-916.
- 424 Hassaan, M. S., Soltan, M. A., Abdel-Moez, A. M., 2015. *Animal Feed Science and Technology*.
425 2015. Nutritive value of soybean meal after solid state fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*
426 for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Anim. Feed Sci. Technology*. 201. 89-98.
- 427 Hertrampf J.W., Piedad-Pascual, F., 2000. *Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds*. Kluwer
428 Academic Publishers. Boston.
- 429 Hisano, H. 2005. Levedura desidratada íntegra, autolisada e componentes da parede celular como
430 pró-nutrientes para a tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): Botucatu, SP: UNESP, 2005, p.90
431 (Doutorado em Zootecnia: Nutrição e Produção Animal) – Universidade Estadual Paulista.
- 432 Hisano, H.; Maruyama, M.R.; Ishikawa, M.M., 2008. Potencial da utilização da mandioca na
433 alimentação de peixes. Cuiabá: Embrapa/Agropecuária Oeste. 29p.
- 434 Holme, M. H., Zeng, C., Southgate, P. C., 2009. A review of recente progress toward development of
435 a formulated microbound diet for mud crab, *Seylla serrata*, larvae and their nutritional requirements.
436 *Aquaculture*, v286, n.3, p. 164-175.
- 437 Instituto Adolfo Lutz, 1985. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos*
438 *para análise de alimentos*. 3 ed. São Paulo: IMESP. p. 21-22.
- 439 Instituto Adolfo Lutz, 2005. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos*
440 *para análise de alimentos*, V.1. 4.ed. São Paulo: PROL. p. 118-119.

- 441 Ju, Z.Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., Kuo, W.C., Horgen, F.D. 2008. Determination of
442 microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino
443 acid profiles. *Aquac. Res.* 39, 118-133.
- 444 Kanazawa, A. and Teshima, S. 1977. Biosynthesis of fatty acids from acetate in the prawn, *Penaeus*
445 *japonicus*. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima University.* 26. 49-53.
- 446 Kanazawa, A., 1990. Protein requirements of penaeid shrimp. In: *Advances in Tropical Aquaculture*,
447 Tahiti French Polynesia, Feb. 20- March 4. 1989. IFREMER/ SDP, Actes Colloq, 9. 261-271.
- 448 Khatoon H., Banerjee S., Yuan, G.T.G., Haris, N., Ikhwanuddin, M, Ambak, M.A., Endut, A.
449 (2017). Biofloc as a potential natural feed for shrimp postlarvae. *Internat. Biodetection. &*
450 *Biodegradation.* 113. 304-309.
- 451 Li, P., Gatlin III, D.M. 2003. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed
452 supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Aquaculture*, 219. 681-692.
- 453 Li, P., Gatlin III, D.M., 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobionic™ AE influence
454 growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass
455 (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture* 231. 445-456.
- 456 Lim, M.H.; Lee, O.H.; Chin, J.E.; Ko, H.M.; Kim, I.C.; Lee, H.B.; Im, S.Y.; Bai, S., 2008.
457 Simultaneous degradation of phytic acid and starch by an industrial strain of *Saccharomyces*
458 *cerevisiae* producing phytase and alpha-amylase. *Biotechnology Letters.* 30, 2125-2130.
- 459 Machado, P.F. 1997. Uso de levedura desidratada na alimentação de ruminantes. In: *Simpósio sobre*
460 *tecnologia da produção e utilização da levedura desidratada na alimentação animal*, 1997, Campinas,
461 *Anais. CBNA, Campinas*, p.111-128.
- 462 Maicá, P.F, Borba, M.R., Wasielesky, W. 2012. Effect of low salinity on microbial floc composition
463 and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-
464 intensive system. *Aquac. Res.* 43, 361–370.

- 465 Martins, C.A., Almeida, V.V., Ruiz, M.R, Visentainer, J.E.L., Matshushita, M., Souza, N.E., 2006 .
466 Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. Rev
467 Nutr.; 19(6): 761-70.
- 468 Millamena, O.M., Bautista, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1996. Methionine requirement of
469 juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. Aquaculture. 143. 403-410.
- 470 Millamena, O.M., Bautista-Tereul, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1997. Threonine requirement
471 of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture, 151, 9-14.
- 472 Millamena, O.M., Bautista-Tereul, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1998. Requirements of
473 juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon* for lysine and arginine. Aquaculture 164. 95–104.
- 474 Millamena, O.M., Bautista-Tereul, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1999. Quantitative dietary
475 requirement of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, iso- leucine, leucine,
476 phenylalanine and tryptophan. Aquaculture, 179, 69–179
- 477 Moss, S.M.; Divakaran, S.; Kim, B.G., 2001. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme
478 activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). Aquac. Res. 32, 125-131.
- 479 NRC, 2011. National Research Council. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Research
480 Council of the National Academies, Washington.
- 481 Pérez-Fuentes, J. A., Pérez-rostro, C. I., Hernández-Vergara, M. P., 2013. Pond-reared Malaysian
482 prawn *Macrobrachium rosenbergii* with the biofloc system. Aquaculture. 400-401. 105-110.
- 483 Qiu, X., Davis, D.A. 2017. Evaluation of flash dried yeast as a nutritional supplement in plant-
484 based practical diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquac. Nutrition. 1-10
- 485 Quintero, H.E.; Roy, L.A. 2010. Practical feed management in semi-intensive systems for shrimp
486 culture. in V. Alday-Sanz. The shrimp book. Nottingham University Press, Nottingham, UK. p. 443–
487 454

- 488 Richard, L., Blanc, P.P., Rigolet, V., Kaushik, S.J., Geurden, I. 2010. Maintenance and growth
489 requirements for nitrogen, lysine and methionine and their utilisation efficiencies in juvenile black
490 tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using a factorial approach. Brit. J. Nutr., 103, 984-995
- 491 Sargent, J. R., Henderson, R. J., Tocher, D.R., 1989. The lipids. Em: Halver, J.E. Ed. Fish Nutrition.
492 Academic Press. San Diego. 152-218.
- 493 Scholz, U.; Garcia Diaz, G.; Ricque D.; Cruz Suarez L. E.; Vargas Albores, F.; Latchford, J., 1999.
494 Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with
495 different yeast products. Aquaculture, 176. 271-283.
- 496 Sgarbieri, V. C., 1999. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) para
497 uso como ingrediente na formulação de alimentos. Braz. J. Food Technol. Campinas. 2. 119-125.
- 498 Sheen, S.S. and D'Abramo, L.R., 1991. Response of juvenile freshwater prawn, *Macrobrachium*
499 *rosenbergii*, to different levels of cod liver oil/corn oil mixture in a semi-purified
500 diet. Aquaculture. 93, 121–134.
- 501 Tacon, AJ, 1989. Nutrición y Alimentación de Peces y Camarones Cultivados. FAO, Brasília.
- 502 Teshima, S., Alam, M.S., Koshio, S., Ishikawa, M., Kanazawa, A. 2002. Assessment of requirement
503 values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). Aquaculture
504 Research, 33, 395-402.
- 505 Tocher, D.R., Fraser, A.J., Sargent, J. R., Gamble, J.C., 1985. Fatty acid composition of
506 phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring
507 (*Clupea harengus* L.). Lipids. 20. 69-74.
- 508 Valle, B.C.S., Dantas Jr, E.M., Silva, J.F.X., Bezerra. R.S., Correia, E.S., Peixoto, S.R.M., Soares,
509 R.B., 2015. Replacement of fish meal by fish protein hydrolysate and biofloc in the diets of
510 *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquac. Nutrition. 21. 105-112.

- 511 Wasielesky, W. Jr, Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L. 2006. Effect of natural production in a
512 zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp
513 *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 258:396–403.
- 514 Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero
515 exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp
516 *Litopenaeus vannamei*. Aquacult. 258. 396–403.
- 517 Wasielesky, W.; Atwood, H.; Stokes, A.; Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero
518 exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp
519 *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 258, 396-403.
- 520 Webster, C.D, Thompson, K.R., Metts, L.S., Muzinic, L.A., 2008. Use of distillers grains with
521 solubles and brewery by-products in fish and crustacean diets. In: Lim C., Webster C. D., Lee C.
522 (Eds). Alternative protein sources in aquaculture diets. The Haworth Press, Taylor and Francis Group.
523 United States and Canada, pp 475-499.
- 524 White, J.A., Hart, R.J., Fry, J.C., 1986. An evaluation of the Waters Pico-tag system for the amino-
525 acid-analysis of food materials. J. Autom. Chemistry. 8. 170-177.

3.2- Capítulo II

Digestibilidade aparente de rações produzidas com um bioproduto composto por biofloco e levedura para juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*

Artigo a ser submetido à revista *Aquaculture Nutrition*

(ISSN: 1353-5773)

As normas de redação e citação deste capítulo atendem às exigências da referida revista, encontradas em: [onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2095/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2095/homepage/ForAuthors.html)

Digestibilidade aparente de rações produzidas com um bioproduto composto por biofloco e levedura para juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*

Bruna Cáritas Souza do Valle^{*a}, Camila Mayara Santos Brito, Roberta Maria Cavalcanti Nery Ferreira^a, Camila Barros Costa^a, Karin Barbosa da Silva^a, José Filipe da Silva^a, Silvio Ricardo Maurano Peixoto^a, Roberta Borda Soares^a

^aUniversidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Laboratório de Tecnologia em Aquicultura, 52171-900, Recife, PE, Brasil*Corresponding author – contact information: e-mail: brunacaritas@hotmail.com

Resumo

Neste estudo foi avaliada a digestibilidade de rações produzidas com um bioproduto composto de farinha de biofloco e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) em substituição à farinha de peixe. Seis rações foram formuladas com substituições crescentes da farinha de peixe pelo bioproduto nomeadas de acordo com a porcentagem de substituição. Um tratamento com ração comercial também foi utilizado perfazendo sete tratamentos. Foi aplicado nas rações 1% de óxido de cromo (Cr_2O_3) como marcador. Juvenis *Litopenaeus vannamei* com peso médio de 7,8g foram alimentados com as rações por 21 dias. A avaliação da digestibilidade das rações indicou que o coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS) foi melhor nas rações com até 150 g kg^{-1} (50%) de substituição da farinha de peixe pelo bioproduto quando comparadas com a ração controle. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a avaliação da digestibilidade da proteína (CDAPB). A digestibilidade da energia (CDAEB) foi equivalente à ração controle nos tratamentos onde a substituição foi de até 90 g kg^{-1} (30%). A digestibilidade dos aminoácidos (CDAAA) da ração BL100 foi mais alta, para a maioria dos aminoácidos

quando comparada com a ração controle (BL0), com exceção da lisina, onde a ração BL50 foi superior. Para metionina, tirosina e aminoácidos totais, não houve diferença entre os tratamentos. Estes resultados indicam a possibilidade da substituição da farinha de peixe pelo bioproduto em até 150 g kg⁻¹ (50%) sem que haja comprometimento na absorção de proteína bruta, matéria seca e aminoácidos para a espécie, na fase avaliada. No entanto, a concentração indicada neste estudo para CDAEB foi de 90 g kg⁻¹ (30%).

Palavras-chave

Aproveitamento de nutrientes; Resíduo; Óxido de cromo; Alimento para camarão, *Saccharomyces cerevisiae*, Farinha de peixe

1.INTRODUÇÃO

Ingredientes com potencial substitutivo à farinha de peixe são estudados no intuito de suprir a carência deste produto no mercado. Diversas pesquisas com o uso de ingredientes de origem vegetal são aplicadas nesta substituição, no entanto alguns fatores como deficiência em aminoácidos, baixa palatabilidade e digestibilidade acabam restringindo seu uso (Davis e Arnold, 2000; Gatlin et al., 2007; Nunes et al., 2006). Outra linha explora a possibilidade do emprego de ingredientes produzidos a partir de material residual ou rejeito como pesquisas que aplicam o bioflocos na produção de alimento para aquicultura (Bauer et al., 2012; Dantas et al., 2016; Valle et al., 2015). O uso do bioflocos em rações aparece como medida sustentável ao destino do resíduo gerado nos sistemas de cultivo do tipo Biofloc Technology BFT.

Os sistemas de bioflocos – BFT possibilita cultivos em altas densidades com mínima ou nenhuma troca de água onde os organismos são cultivados em um meio rico em microrganismos, responsáveis por manter a qualidade da água no sistema. O

bioflocos apresentam em sua composição algumas espécies de zooplâncton e microalgas, além de resíduos de ração e fezes dos animais (Avnimelech, 2007) e atuam como uma fonte extra de alimento para os organismos cultivados reduzindo a conversão alimentar e consequentemente os custos com alimentação (Emerenciano, Gaxiola e Cuzon, 2013). O aumento do volume do bioflocos aumenta com o tempo de cultivo, pode prejudicar os animais causando, por exemplo, entupimento de brânquias e queda do oxigênio dissolvido no sistema. Assim, parte do bioflocos precisa ser removida e um dos potenciais destinos estudados para este material é a sua aplicação em rações.

Por ter uma composição variável, seu teor proteico difere entre os cultivos e esta diferença gera bioflocos com concentração média de proteína de 26% (Dantas et al., 2016; Emerenciano et al., 2012; Ju et al., 2008; Maicá et al., 2012). No entanto, deficiências nutricionais como concentração de proteína e aminoácidos, inferiores às da farinha de peixe, podem restringir o seu uso. Na tentativa de melhorar seu conteúdo nutricional, este trabalho propõe o enriquecimento da farinha de bioflocos utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Este microrganismo é amplamente utilizado tanto na alimentação humana quanto animal e na aquicultura, atua como suplemento alimentar e fonte de proteína alternativa à farinha de peixe (Deng et al., 2013; Hauptman et al., 2014; Peterson Booth e Manning, 2012; Vechlang et al., 2012). As leveduras tem alto valor proteico, excelente perfil de aminoácidos, são ricas em vitaminas do complexo B e apresentam elevada digestibilidade (Lee e Lawrence, 1997; García-Galano, 2007). A associação da levedura com a farinha de bioflocos resulta em um bioproduto que pode ser capaz de substituir a farinha de peixe parcial ou totalmente. Porém, a avaliação deste bioproduto em termos de absorção dos nutrientes pelo animal permitirá conhecer sua eficiência na nutrição dos organismos cultivados.

O potencial de um alimento é principalmente referenciado pela sua composição nutricional e por sua capacidade digerível. Alimentos produzidos para a aquicultura necessitam ser altamente digeríveis para o maior aproveitamento dos nutrientes e minimizar problemas com a qualidade de água. Por tanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a digestibilidade aparente de dietas formuladas com um bioproduto composto por biofloco e levedura em substituição à farinha de peixe na alimentação de juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Bioproduto

Uma proporção de 9:1 de farinha de biofloco e levedura, respectivamente, foi utilizada para a produção do bioproduto que foi posteriormente utilizado na formulação das rações experimentais.

A cepa de levedura utilizada para o bioproduto foi a *Saccharomyces cerevisiae* INCQS 40002 (ATCC 9763) doada pela Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro.

A ativação da levedura foi feita utilizando caldo YPD composto por extrato de levedura, peptona e dextrose. Após seu crescimento em estufa de germinação, uma alíquota do caldo (25µL) foi inoculado em meio YPD sólido, próprio para o crescimento da espécie e novamente incubado para crescimento das colônias a 27°C por 72h. Após este período, foi adicionada água destilada estéril às placas e raspadas as colônias para obtenção de um caldo de leveduras. O caldo foi posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o decantado de células congelado a -80°C sendo, posteriormente, submetido à liofilização e enviado para análise de composição nutricional.

O biofloco utilizado para a produção da farinha foi coletado de uma carcinicultura comercial (Pernambuco/Brasil), através de um sistema de decantação instalado ao lado dos tanques. Em seguida, o biofloco retido foi sucessivamente filtrado em malhas com diferentes porosidades (250, 50 e 10 μ m) e seco a 50°C em estufa de recirculação de ar forçada. Após, o material seco foi triturado e acondicionado em freezer a -20°C para posterior análise de composição nutricional.

2.2 Rações experimentais

As rações experimentais foram formuladas com 350g kg⁻¹ de proteína bruta e 300 kg⁻¹ de farinha de peixe na ração controle (BL0) tendo substituições crescentes da farinha de peixe pelo bioproduto em 0%, 10% (30 g kg⁻¹), 30% (90 g kg⁻¹), 50% (150 g kg⁻¹), 70% (180 g kg⁻¹) e 100% (300 g kg⁻¹) sendo nomeadas de BL0, BL10, BL30, BL50, BL70 e BL100, respectivamente (Tabela 2). Os ingredientes foram previamente moídos e misturados seguindo o padrão de ingredientes secos primeiro e posteriormente os úmidos. Dez (10) g kg⁻¹ de óxido de cromo (Cr₂O₃) foi adicionado às rações como marcador inerte e 30g/kg de ágar na ração comercial como ligante. A massa resultante foi peletizada com diâmetro de 2,4mm e seca em estufa de recirculação de ar forçada a 50°C. As rações produzidas foram acondicionadas a -20°C até posterior análise de composição nutricional.

2.3 Delineamento experimental e coleta das fezes

O experimento contou com seis tratamentos composto pelas rações experimentais e um tratamento com ração comercial, com três repetições cada, num total de 21 parcelas experimentais. As parcelas foram distribuídas em um sistema de recirculação de água clara com filtragens mecânica e biológica responsáveis pela qualidade da água no sistema. Os tanques circulares com volume útil de 300L foram

povoados com 35 camarões cada, com peso médio de $7,28 \pm 0,1278\text{g}$. A coleta das fezes foi iniciada somente a partir do quinto dia de alimentação dos camarões para adaptação dos animais às rações experimentais. A alimentação foi ofertada três vezes ao dia, nos horários de 08:00, 13:00 e 17:00h considerando 8% da biomassa animal, de acordo com a biometria semanal. O alimento permanecia à disposição dos animais pelo período de 01 (uma) hora e após este período os tanques eram sifonados para remoção de sujidades. A coleta das fezes era realizada em duas etapas, 1 e 2 horas após o sifonamento, exemplo: alimentação- 08:00h; sifonamento- 09:00h; 1ª coleta de fezes- 10:00h; 2ª coleta de fezes-11:00h.

As coletas eram feitas apenas após as refeições das 08:00h e das 13:00h. Para este procedimento foram utilizadas pipetas Pasteur e as fezes eram acondicionadas em tubos resfriados para manter a integridade das amostras. Ao término de cada coleta as fezes eram centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante descartado e o decantado suspenso em água destilada estéril para remoção dos sais. Em seguida as fezes eram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e o material congelado a -20°C . As fezes coletadas durante todo o período experimental, com umidade média de 81,9%, foram liofilizadas e seguiram para análise de concentração de nutrientes e cromo em laboratório comercial.

Os parâmetros de temperatura, salinidade, oxigênio, pH e ainda amônia e nitrito foram avaliados diariamente apresentando médias ($\pm$ DP) de $27,08 \pm 1,21^{\circ}\text{C}$; $30,02 \pm 0,47\text{g L}^{-1}$; $6,22 \pm 0,62\text{ mg L}^{-1}$; $7,37 \pm 0,16$; $0,013 \pm 0,01\text{ mg L}^{-1}$ e $0,87 \pm 0,27\text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

2.4 Análises

As análises de composição centesimal, aminoácidos e ácidos graxos da levedura, farinha de biofloco e rações foram realizadas em laboratório comercial utilizando os respectivos métodos: proteína bruta – método Dumas (Association of Official Analytical Chemists - AOAC, 2007); extrato etéreo - pelo método Soxhlet (Instituto Adolfo Lutz, 2005; AOAC, 1995); matéria mineral - técnica de incineração em mufla; umidade - umidade e voláteis (Instituto Adolfo Lutz, 1985); ácidos graxos - HPLC (AOAC, 2005) e aminoácidos -HPLC como derivados do PITC (White et al.,1986; Hagen et al., 1989). A avaliação da concentração do óxido de cromo na ração e nas fezes foi feita pelo método de Espectrometria de Absorção atômica (Instituto Adolfo Lutz, 2005).

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (CDAMS), proteína (CDAPB), aminoácidos (CDAAA) e energia bruta (CDAEB) foram calculados segundo Cho, Slinger e Bayley (1982):

$$CDAMS=100-[100(Cr_{ração}/Cr_{fezes})]$$

$$CDAN=100-[100(Cr_{ração}/Cr_{fezes}) \times (N_{fezes}/N_{ração})]$$

Onde:

$Cr_{ração}$ = % de óxido de cromo na ração

Cr_{fezes} = % de óxido de cromo nas fezes

CDAN = Coeficiente de digestibilidade aparente do nutriente (proteína, aminoácidos, energia) na dieta

$N_{ração}$ = % do nutriente (proteína, aminoácidos, energia) na ração

N_{fezes} = % do nutriente (proteína, aminoácidos, energia) nas fezes

Os parâmetros de qualidade da água, crescimento dos camarões, sobrevivência e coeficiente de digestibilidade aparente foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade das variâncias (Levene's) e, posteriormente, submetidos à análise de variância ($p < 0,05$) e aplicado o teste Tukey utilizando o programa Statistica 7.0.

3. RESULTADOS

A composição nutricional dos ingredientes do bioproduto e da farinha de peixe utilizados na produção das rações experimentais e ilustrados na Tabela 1 indicam a proximidade dos níveis de proteína entre a farinha de peixe e a levedura que compõe o bioproduto. O mesmo é observado para o perfil de aminoácidos destes ingredientes. Ambos os ingredientes do bioproduto (biofloco e levedura) apresentaram em sua composição todos os aminoácidos essenciais.

O conteúdo de cinzas presente no biofloco foi muito superior ao encontrado na farinha de peixe o que pode implicar negativamente na digestibilidade das rações com maiores concentrações do bioproduto.

Inserir Tabela 1

A formulação das rações experimentais e suas respectivas composições proximais, assim como da ração comercial, estão descritas na Tabela 2.

Inserir Tabela 2

Os aminoácidos essenciais das rações experimentais acompanharam a necessidade nutricional da espécie para a fase estudada e não foram observados decréscimos significativos conforme o aumento na substituição pelo bioproduto, com exceção da metionina. No entanto, a concentração de lipídeos (Tabela 2) e ácidos graxos nas rações reduziu conforme a diminuição do uso da farinha de peixe (FP) nos tratamentos com maiores substituições de FP pelo bioproduto (Tabela 3). Este fator

está relacionado ao teor lipídico da farinha de peixe que é superior ao do bioproduto, no entanto, esta deficiência pode ser solucionada com a adição de outras fontes lipídicas como óleo de peixe ou óleos vegetais à dieta.

Inserir Tabela 3

Ao término de 21 dias de experimento não foram observadas diferenças significativas nos pesos inicial e final, e sobrevivência dos camarões com médias ($\pm$ DP) de $7,28 \pm 0,985$ g, $8,092 \pm 1,21$ g e $97,14 \pm 1,94\%$, respectivamente.

O coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (CDAMS), proteína bruta (CDAPB) e energia bruta (CDAEB) das rações com substituição gradual da farinha de peixe pelo bioproduto proposto estão descritos na Tabela 4. A avaliação do CDAMS não indicou diferença significativa entre as rações com substituição de até 50% da farinha de peixe pelo bioproduto. Para o CDAPB não houve diferença significativa entre os tratamentos quando comparados entre si e com a ração controle. Já para o CDAEB foi observado um decréscimo na taxa conforme a redução da farinha de peixe nas rações, apresentando melhor resultado com substituições de até 30% ou seja, 90 g kg^{-1} do bioproduto. Sendo a concentração de energia bruta referente à energia disponibilizada por proteína, lipídeos e carboidratos, o baixo CDAEB pode estar relacionado tanto à baixa digestibilidade dos lipídeos quanto dos carboidratos visto que para a digestibilidade da proteína não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. No entanto, no presente estudo, não foram avaliadas as digestibilidades de lipídeos e carboidratos para que fosse possível constatar a relação. Contudo, se comparadas às médias de coeficiente de digestibilidade aparente de todas as rações avaliadas são encontradas taxas nas rações

experimentais superiores às encontradas na ração comercial, tanto para o CDAEB quanto para os demais coeficientes de digestibilidade aparente.

Inserir Tabela 4

Em geral observou-se uma tendência de aumento da digestibilidade dos aminoácidos quanto maior o nível de substituição. O coeficiente de digestibilidade aparente dos aminoácidos (DAAA) das rações experimentais está expresso também na Tabela 4. Foi possível constatar que a ração com maior substituição da farinha de peixe pelo bioproduto (BL100) apresentou resultados de digestibilidade aparente superiores à ração controle (BL0) para quase todos os aminoácidos, exceto para a lisina onde BL50 mostrou-se superior. Já para metionina, tirosina e aminoácidos totais não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

4. DISCUSSÃO

O uso de biofloco como fonte de nutriente em rações para aquicultura ganha espaço nas pesquisas pela necessidade de se encontrar uma aplicação para este resíduo após sua saída dos sistemas de cultivo. Entretanto, as variações que podem ocorrer em sua composição nutricional limitam seu uso como ingrediente proteico substituinte da farinha de peixe. Dantas et al (2016), ao trabalhar com alimentação de pós-larvas do *L. vannamei* restringiu o uso da farinha de biofloco, em substituição à farinha de peixe, em até 30% (120 g kg^{-1}) devido à baixa concentração proteica do biofloco utilizado em seu ensaio (247 g kg^{-1}), a mesma concentração encontrada para o biofloco utilizado no presente estudo.

A aplicação da levedura *S. cerevisiae* à farinha de biofloco (FB) elevou o conteúdo proteico do produto e possibilitou substituições da farinha de peixe de até 300 g kg⁻¹ (100%) aliada aos demais ingredientes, embora com os níveis de metionina e ácidos graxos essenciais inferiores aos recomendados.

A levedura *S. cerevisiae*, é uma potencial fonte de nutrientes utilizada como aditivo em dietas para organismos aquáticos (Achupallas et al., 2016; Qiu, et al. 2016; Liang et al. 2017), além de ser considerada um alimento de elevada digestibilidade proteica para camarões de acordo com Lee e Lawrence (1997).

Conhecer da digestibilidade do alimento ajuda a entender seu potencial de absorção pelo organismo. Além de um aproveitamento deficiente dos nutrientes, dietas com baixa digestibilidade levam ao acúmulo de compostos nitrogenados no ambiente de cultivo desencadeando doenças nos camarões cultivados e consequente mortalidade (Lin et al., 2006; Cho, 2008).

Informações sobre a digestibilidade de rações produzidas com o biofloco são escassas, mesmo sendo uma importante ferramenta para comprovar a eficácia do produto. Ao testar a digestibilidade de rações produzidas com dois tipos de biofloco, Sabry Neto (2015) verificou que a digestibilidade aparente da proteína bruta (CDAPB) nas duas rações (73,1% e 75%) foram inferiores à dieta sem o biofloco (80,9%). Mesmo com a substituição da farinha de peixe pelo bioproduto no presente estudo, as rações não apresentaram diferença no CDAPB quando comparadas entre si (~ 75,56%), com a ração controle (75,21%) e com a ração comercial (67,16%), diferindo do descrito pelo autor citado. Esta ausência de diferença no CDAPB pode estar relacionada à elevada digestibilidade da levedura, semelhante a da farinha de peixe, relatada por Hauptman et al.(2014) para truta arco-íris, de 97,6 e 97%, respectivamente. Segundo Lee e Lawrence (1997), a digestibilidade proteica da

levedura *S. cerevisiae* para espécies de camarões peneídeos está em torno de 85%, o que indica que o resultado encontrado para o CDAPB no presente estudo está relacionado à capacidade da levedura no auxílio à digestão. Segundo alguns autores, a inclusão de levedura na dieta melhora a taxa de eficiência alimentar e a digestibilidade das rações por conter numerosas enzimas, entre elas a protease, que são liberadas no intestino e complementam as enzimas endógenas, apoiando a digestão do alimento (Hisano et al. 2004; Jonvel, 1993; Watanabe, 2006).

No entanto, diferenças na digestibilidade proteica de leveduras da mesma espécie podem acontecer. Qiu e Davis (2017) ao avaliarem a digestibilidade de uma levedura seca, também do gênero *S. cerevisiae* para o *L. vannamei*, encontraram resultados de CDAPB de 53,47%. Esta diferença entre os resultados pode estar relacionada ao modo como foi produzida. Segundo Hertrampf e Piedad-Pascual (2000), a digestibilidade aparente da levedura é alta, no entanto, o tipo de tratamento que é dado durante sua produção, como o tipo de secagem, afeta a digestibilidade.

Ao avaliarem os CDA da ração produzida com a levedura, Qiu e Davis (2017) encontraram valores de CDAPB (79,47%) e CDAEB (69,18%), ou seja, muito próximos aos valores médios encontrados no presente trabalho que foram de 75,83% e de 69,71%, respectivamente. No entanto, observou-se uma diminuição gradativa da digestibilidade da energia (de 71,53% em BL0 para 63,71% em BL100) que apresentou uma relação direta com a disponibilidade de lipídeos nas rações, sendo reduzida conforme aumenta a substituição da farinha de peixe pelo bioproduto. No entanto, o CDAMS no estudo destes autores foi superior (62,18%) ao registrado no presente estudo (51,78%), fato que pode estar relacionado à baixa digestibilidade da farinha de biofloco, descrita por Sabry Neto (2015). A digestibilidade da farinha de biofloco avaliada pelo mesmo autor apresentou-se entre 25,7 e 26%, devido à alta

concentração de cinzas. Níveis elevados deste resíduo inorgânico também são relatados por outros autores em diversas pesquisas com o biofloco (Wasielesky et al., 2006; Ju et al., 2008; Emerenciano et al., 2012). Embora os valores médios de coeficiente de digestibilidade aparente de matéria seca das rações tenham sido baixos no presente estudo, as rações com até 210 g kg⁻¹ (70%) do bioproduto em substituição à farinha de peixe tiveram CDAMS superiores à ração comercial tendo esta, média semelhante à substituição mais elevada (BL100). Traçando um comparativo entre os coeficientes de digestibilidade aparente de PB e MS é possível identificar médias superiores para o CDAPB o que pode ser atribuído à importância da proteína para nutrição de peneídeos comparada ao baixo requerimento de carboidratos e lipídeos (Shiau, 1998; Dall et al., 1990).

Informações sobre a digestibilidade dos aminoácidos é fator importante na adequada formulação de alimento para os camarões, e a definição da qualidade deste alimento a partir do coeficiente de digestibilidade dos aminoácidos é cada vez mais considerada, já que são responsáveis pelo bom funcionamento do organismo servindo como fonte de energia e combustível metabólico (Cruz-Suárez et al., 2009; Lemos et al., 2009; Yang et al., 2009; Terrazas-Fierro et al., 2010; Kaushik e Seiliez, 2010). No presente estudo, o CDAAA da ração BL100 foi mais alto, para a maioria dos aminoácidos, se comparada ao tratamento controle (BL0), inclusive para lisina (86,95%), aminoácido limitante. Esta resposta é apoiada na capacidade das leveduras no auxílio à digestão, como mencionado anteriormente (Jonvel, 1993). As rações elaboradas com o bioproduto apresentaram taxas de CDAAA de mínimo e máximo, entre os aminoácidos essenciais, de 69,19% (valina) e 88,65% (lisina), considerados valores elevados se comparados com outros ingredientes de origem animal e vegetal,

VALLE, B.C.S.F. Aplicação de um bioproduto composto por biofloco e levedura...

utilizados na formulação de rações em substituição à farinha de peixe (Oujifard et al., 2012; Panini et al., 2017).

5. CONCLUSÃO

As rações formuladas com o bioproduto de biofloco e levedura mostraram potencial de uso em rações para juvenis do *L. vannamei* em relação ao seu coeficiente de digestibilidade. Os resultados indicam a possibilidade de aplicação do bioproduto em substituição à farinha de peixe em até 150 g kg⁻¹ (50%), substituição que apresentou, em geral, os melhores resultados, com exceção do CDAEB onde a concentração indicada foi de até 90 g kg⁻¹ (30%). No entanto, estudos posteriores irão avaliar os efeitos desta substituição no desempenho de juvenis do *L.vannamei*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achupallas, J.M., Zhou, Y. and Davis, D.A.. 2016. Pond production of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed grain distillers dried yeast. Aquaculture Nutrition, 22, 1222–1229.
- AOAC, 1995. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists. Arlington. chapter 33. (method 920.39, C). 10-1.
- AOAC, 2007. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18. Crude protein in meat and meat products including pet foods. Ed. rev. 2. Gaithersburg. 39. (method 992. 15). 6-7.

- AOAC. 2005 Official Methods of Analyses of the Association of Analytical Chemists. 18. ed., (method 996.06). 20-25.
- Avnimelech, Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture*, 264, 140-147.
- Bauer, W., Prentice-Hernandez, C., Tesser, M.B., Wasielesky, W., Poersch, L.H.S., 2012. Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v 342-343, 112–116.
- Cho, C. Y., Slinger, S. J., & Bayley, H. S. 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: Energy intake, expenditure and productivity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 73, 25–41.
- Cho, Y.C. 2008. Development of high nutrient-dense diets and fish feeding systems for optimum production and aquaculture waste reduction: A treatise, In: Lim, C.; Webster, C.D.; Lee, CS (Eds.) *Alternative protein sources in aquaculture diets*. The Haworth Press, Taylor & Francis Group. New York. Pp 17-49.
- Cruz-Suárez, L.E., Tapia-Salazar, M., Villarreal-Cavazos, D., Beltran-Rocha, J., Nieto-López, M.G., Lemme, A., Ricque-Marie, D. 2009. Apparent dry matter, energy, protein and mono acids digestibility of four soybean ingredients in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*. 292, 87-94.
- Dall, W., Hill, B.J., Rothlisberg, P.C., Sharples, D.J. 1990. The biology of the Penaeidae. *Advances in marine biology*. Academic Press, London, Great Britain. 27, 489pp.
- Dantas, E. M., Valle, B.C.S., Brito, C.M.S., Calazans, N.K.F., Peixoto, S.R.M., Soares, R.B., 2016. Partial replacement of fishmeal with biofloc meal in the diet of postlarvae of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 22, 335-342.
- Davis, D.A.; Arnold, C.R. 2000. Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopennaeus vannamei*. *Aquaculture*, 235, 291-298.
- Deng, D., Mei, C., Mai, K., Tan, B. P., Ai, Q., & Ma, H. 2013. Effects of a yeast-based additive on growth and immune responses of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), and aquaculture environment. *Aquaculture Research*, 44, 1348–1357.

- Emerenciano, M., Cuzon, G., Arévalo, M., Gaxiola, G. 2012. Biofloc technology applied to intensive broodstock farming of pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Part II): spawning performance, biochemical composition and fatty acid profile. *Aquaculture Research* (submitted)
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, Gerard. 2013. Biofloc Technology (BFT): A review for Aquaculture Application and animal food Industry. In: Biomass Now- Cultivation and utilization. INTECH. <http://dx.doi.org/10.5772/53902>
- Fox, J.M., Lawrance, A.L., Li-Chan, E. 1995. Dietary requirements for Lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. *Aquaculture*, 131, 279-290.
- García-Galano T., 2007. Ingredientes procedentes de organismos unicelulares, in: García-Galano T., Colmenares H. V., Fenucci J. L. (Eds). Manual de ingredientes proteicos y aditivos empleados en la formulación de alimentos balanceados para camarones peneidos. Editora EUEM, 1ª edição Mar del Plata. pp 185-203.
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, A., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, 38, 551–579.
- Glencross, B. and Smith D.M. 1999. The linoleic and linolenic acids requirements of the prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition*, 5, 53-64.
- González-Félix, M.L., Gatlin III, D.M., Lawrence, A.L., Pérez-Velázquez. 2003. Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: II. Effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated and highly unsaturated fatty acids on juvenile shrimp growth, survival, and fatty acid composition. *Aquaculture Nutrition*, 9, 115-122.
- Hagen, S.R., Frost, B., Augustin, J., 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid-chromatographic of amino acids in food. *J.Assoc. Off. Anal. Chemists*, 72 (6), 912-916
- Hauptman, B. S., Barrows, F. T., Block, S. S., Gaylord, T. G., Paterson, J. A., Rawles, S. D., & Sealey, W. M. 2014. Evaluation of grain distillers dried yeast as a fish meal substitute in practical-type diets of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 432, 7–14.

- Hisano, H.; Pezzato, L.E.; Barros, M.M. Freire, E.S.; Gonçalves, G.S.; Ferrari, J.E.C. 2004. Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Acta Scientiarum, v.26, n.2, p.171-179.
- Instituto Adolfo Lutz, 1985. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3 ed. São Paulo: IMESP. p. 21-22.
- Instituto Adolfo Lutz, 2005. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, v.1. 4.ed. São Paulo: PROL. P. 118-119.
- Jonvel, S. 1993. Use of yeast in monogastrics. Feed Mix, 1. 4.
- Ju ZY, Forster I, Conquest L, Dominy W, Kuo WC, Horgen FD. 2008. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. Aquaculture Research, 39, 118-133.
- Kaushik, S.J. and Seiliez, I. 2010. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish. Aquaculture Research, 41, 322-332.
- Lee, P. G., Lawrence, A. L., 1997. Digestibility. Em: D'Abramo L. R, Conklin, D. E. Y., Akiyana, D. M. Ed. Crustacean Nutrition, 6, 194-240.
- Lemos, D., Lawrence, A.L., Siccardi, A.J. 2009. Prediction of apparent protein digestibility of ingredients and diets by *in vitro* pH stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for juvenile Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture, 295, 89-98.
- Liang, X.F., Hu, L., Dong, Y.C., Wu, X.F., Qin, Y.C., Zheng, Y.H., Shi, D.D., Xue, M., Liang, X.F. 2017. Substitution of fish meal by fermented soybean meal affects the growth performance and flesh quality of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). Animal Feed Science and Technology, 229, 1-12.
- Lin, H.Z., Li, Z.J., Chen, Y.Q., Zheng, W.H., Yang, K., 2006. Effect of dietary traditional Chinese medicines on apparent digestibility coefficients of nutrients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. National Research Council of the National Academies, Washington, DC, USA. Aquaculture, 253, 495–501.
- Maicá, P.F., Borba, M.R., Wasielesky, W. 2012. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. Aquaculture Research, 43, 361–370.
- Millamena, O.M., Bautista-Tereul, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1997. Threonine requirement of juvenile marine shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture, 151, 9-14.

- Millamena, O.M., Bautista-Tereul, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1998. Requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon* for lysine and arginine. *Aquaculture*, 164, 95–104.
- Millamena, O.M., Bautista-Tereul, M.N., Reyes, O.S., Kanazawa, A., 1999. Quantitative dietary requirement of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, iso-leucine, leucine, phenylalanine and tryptophan. *Aquaculture*, 179, 69–179.
- Nunes, A.J.P., Sa, M.V.C., Felipe Andriola-Neto, F., Lemos, D. 2006. Behavioral response to selected feed attractants and stimulants in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 260, 244–254.
- Oujifard, A., Seyfabadi, J., Kenari, A.A., Rezaei, M. 2012. Growth and apparent digestibility of nutrients, fatty acids and amino acids in Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*, feed diets with rice protein concentrate as total and partial replacement of fish meal. *Aquaculture*, 342-343, 56-61.
- Panini, R. L., Freitas, L. E. L., Guimarães, A. M., Rios, C., Silva, M. F. O., Vieira, Felipe N., Fracalossi, D. M., Samuels, R. I., Prudêncio, E. S., Silva, C. P. , Amboni R. D.M.C. 2017. Potential use of mealworms as an alternative protein source for Pacific white shrimp: Digestibility and performance. *Aquaculture*, 473, 115-120.
- Peterson, B. C., Booth, N. J., & Manning, B. B. 2012. Replacement of fish meal in juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, diets using a yeast-derived protein source: The effects on weight gain, food conversion ratio, body composition and survival of catfish challenged with *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture Nutrition*, 18, 132–137.
- Qiu, X., Buentello, A., Shannon, R., Mustafa, A., Abebe A., Davis, D.A. 2016. Evaluation of three non-genetically modified soybean cultivars as ingredients and a yeast-based additive as a supplement in practical diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 1-11.
- Qiu, X., Davis, D.A. 2017. Evaluation of flash dried yeast as a nutritional supplement in plant-based practical diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 1-10.
- Richard, L., Blanc, P.P., Rigolet, V., Kaushik, S.J., Geurden, I. 2010. Maintenance and growth requirements for nitrogen, lysine and methionine and their utilisation efficiencies in juvenile black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using a factorial approach. *Brit. J. Nutr.*, 103, 984-995

- Sabry- Neto, H. 2015. Valor nutricional de flocos microbianos e rações vegetais para o desempenho zootécnico do camarão branco, *Litopenaeus vannamei*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará. Instituto de Ciências do Mar. Fortaleza.
- Shiau, S. Y. 1998. Nutrient Requirements of Penaeid shrimps. *Aquaculture*, 164, 241-250.
- Terrezas-Fierro, M., Civera-Cerecedo, R., Ibarra-Martínez, L., Goytortua-Boris, E., Herrera-Andrade, M., Reyes-Becerra, A. 2010. Apparent digestibility of dry matter, protein and essential amino acid in marine feedstuffs for juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 308, 166-173.
- Teshima, S., Alam, M.S., Koshio, S., Ishikawa, M., Kanazawa, A. 2002. Assessment of requirement values for essential amino acids in the prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Bate). *Aquaculture Research*, 33, 395-402.
- Valle, B.C.S., Dantas Jr, E.M., Silva, J.F.X., Bezerra, R.S., Correia, E.S., Peixoto, S.R.M., Soares, R.B., 2015. Replacement of fish meal by fish protein hydrolysate and biofloc in the diets of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture Nutrition*, 21, 105-112.
- Vechklang, K., Lim, C., Boonanuntanasarn, S., Welker, T., Ponchunchuwong, S., Klesius, P. H., & Wanapu, C. 2012. Growth performance and resistance to *Streptococcus iniae* of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemented with GroBiotic- A and Brewtech dried brewers yeast. *Journal of Applied Aquaculture*, 24, 183–198.
- Wasielisky Jr., W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L. 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403.
- Watanabe, A.L. 2006. Suplementação de levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) e derivados na alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 82f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, SP
- White, J.A., Hart, R.J., Fry, J.C., 1986. An evaluation of the Waters Pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. *J. Autom. Chemistry*, 8, 170-177.
- Yang, Q., Zhou, X., Zhou, Q., Tan, B., Xi, S., Dong, X., 2009. Apparent digestibility of selected feed ingredients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. *Aquaculture Research*, 40, 1-9.

Tabela 1. Análise proximal, aminoácidos e ácidos graxos dos principais ingredientes (g kg⁻¹)

	Farinha de peixe	Levedura ATCC 9763	Farinha de biofloco (FB)	Bioproduto
<i>Aminoácidos essenciais</i>				
Arginina	42,2	41,7	10,4	13,5
Fenilalanina	22,1	31	10,7	12,7
Histidina	19,6	18,18	3,3	4,8
Isoleucina	20,8	37	8,2	11,1
Leucina	41,5	8,9	15,6	14,9
Lisina	39,2	63,3	8,2	13,7
Metionina	17,4	11,76	2,7	3,6
Treonina	24,9	36,79	10	13,6
Valina	28,9	41,07	1,38	16,5
<i>Aminoácidos não essenciais</i>				
Ácido aspártico	57,6	85,35	11,9	19,24
Ácido glutâmico	84,8	93,9	21,6	28,83
Alanina	44,7	51,55	15,1	18,74
Glicina	72,1	35,51	15,6	17,59
Cistina	9,4	5,13	1,3	1,68
Prolina	38,7	30,37	10	12,04
Serina	29,4	46,63	10,1	13,75
Taurina	10,9	ND	0,1	0,09
Tirosina	17,2	27,16	7,2	9,2
<i>Ácidos graxos</i>				
Gorduras Saturadas		16,89	2,4	3,85
Gorduras insaturadas		20,53	1,5	3,4
Gorduras Monoinsaturadas		19,89	1	2,89
Gorduras Poli-insaturadas		0,64	0,5	0,51
<i>Análise proximal</i>				
Proteína bruta	719,8	712,7	247,1	279,4
Extrato etéreo	90,2	37,43	4	7,3
Cinzas	127,3	70	366	278,9
Umidade	94,2	20	86,3	79,7

Tabela 2. Formulação e composição proximal das rações experimentais (g kg^{-1}) produzidas com o bioproduto em substituição à farinha de peixe

<i>Ingredientes</i>	Tratamentos						Comercial
	BL0	BL10	BL30	BL50	BL70	BL100	
Farinha de peixe	300	270	210	150	90	0	
Bioproduto	0	30	90	150	210	300	
Farelo de soja	60	90	120	150	180	230	
Farelo de trigo	170	170	170	170	170	170	
Farinha de trigo	240	210	160	130	130	80	
Farinha de vísceras	100	100	120	120	120	120	
Farinha de cabeça de camarão	30	30	30	30	30	30	
Gelatina	10	10	10	10	20	30	
PREMIX*	10	10	10	10	10	10	
Óleo de peixe	20	20	20	20	20	20	
Goma de mandioca	50	50	50	50	10	0	
Óxido de cromo	10	10	10	10	10	10	
<i>Análise proximal</i>							
Proteína bruta	354,4	352,6	352,5	353,7	348,2	353,1	380,6
Extrato etéreo	95,6	81,7	74,4	71,9	70,6	63,4	75,2
Cinzas	121,6	125,8	137,1	151,1	157,9	169,7	130,05
Umidade	90,6	100,8	118,1	107,4	122,1	120,7	75,6
Matéria seca	909,4	899,2	881,9	892,6	877,9	879,3	924,4
Energia bruta (cal g^{-1})	4.372	4.308	4.150	3.909	3.787	3.736	3.258

*Premix min. e vit. (Supremais, Campinas-SP): Composição por quilo de produto : Vit. A = 1.200.000 UI; vit. D3 = 200.000 UI; vit. E = 12.000 mg; vit. K3 = 2400 mg; vit. B1 = 4800 mg; vit. B2 = 4800 mg; vit. B6 = 4000 mg; vit. B12 = 4800 mg; ác. fólico = 1200 mg; pantotenato de cálcio = 12.000 mg; vit. C = 48.000 mg; biotina = 48 mg; colina = 65.000 mg; ácido nicotínico = 24.000 mg; Fe = 10.000 g; Cu = 600 mg; Mn = 4000 mg; Zn = 6000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg e Se = 20 mg.

Tabela 3. Aminoácidos e ácidos graxos das rações experimentais e níveis recomendados para juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei* (g kg⁻¹)

Aminoácidos essenciais	Tratamentos						Níveis recomendados
	BL0	BL10	BL30	BL50	BL70	BL100	
Arginina	22,6	22	22,6	22	21,7	22,3	19 ^a
Fenilalanina	12	12,5	12,6	13,1	12,7	13,1	14 ^b
Histidina	8,1	8,9	8,3	8,7	8,3	8,3	8 ^b
Isoleucina	13,3	13,4	13,2	14,1	13,5	13,5	10 ^b
Leucina	22,8	23,2	23	24,2	23	23,2	17 ^b
Lisina	21,2	22,5	22,2	22,4	20,9	21,5	16 ^e
Metionina	7,1	7,1	6,8	6,4	5,9	5,6	9 ^c
Treonina	12,1	12,6	12,8	12,8	13,1	12,9	14 ^d
Valina	15	15,4	15,2	15,7	15	15,5	14 ^f
<i>Aminoácidos não essenciais</i>							
Ácido aspártico	20,5	24,8	25,7	27,5	25,8	28,6	
Ácido glutâmico	43,4	46,7	47,2	47,8	45,1	48,2	
Alanina	21,7	21,6	21,2	21,3	20,2	21	
Cistina	3,7	4,5	4,7	4,5	4,1	4,5	
Glicina	31,7	29,6	28,7	27,4	26,3	26,8	
Prolina	23,3	22,3	21,4	20,9	20,4	21	
Serina	15,4	15,6	15,8	15,6	15,7	15,8	
Taurina	2,2	2	1,6	1,7	1,4	0,9	
Tirosina	9,5	9,9	10	10	9,5	10	
<i>Ácidos graxos</i>							
Gorduras saturadas (SFA)	24,1	21,2	18,8	18,8	19,9	16,4	
Gorduras monoinsaturadas (MUFA)	25,9	22,6	20,8	19,9	23	17,8	
Gorduras insaturadas (HUFA)	71,5	60,5	55,6	53,1	57,7	47	
Gorduras poliinsaturadas (PUFA)	45,6	37,9	34,8	33,3	34,8	29,2	
Ác. Linoleico (18:2n-6)	29,1	25,1	23,9	23,9	29,3	22,4	12 ^g
Ác. Linolenico (18:3n-3)	3,9	3,1	2,9	2,8	2,8	2,4	12 ^g
EPA (20:5n-3)	3,5	2,6	2,1	1,6	0,4	1	5 ^h
DHA (22:6n-3)	6,1	4,7	3,7	3	0,7	1,8	5 ^h
ARA (20:4n-6)	1,6	1,3	1,2	1,1	1	1	5 ^h

a Millamena et al. (1998)

b Millamena et al. (1999)

c Richard et al. (2010)

d Millamena et al. (1997)

e Fox et al. (1995)

f Teshima et al. (2002)

g Glencross and Smith (1999), para *P. monodon*

h Gonzalez-Félix et al. (2003)

EPA= Ác. Eicosapentaenoico

DHA= Ác. Docosahexaenóico

ARA= Ác. Araquidônico

Tabela 4. Digestibilidade aparente dos nutrientes das rações experimentais e comercial (% $\pm$ DP)

<i>Aminoácidos essenciais</i>	Tratamentos						COM
	BLO	BL 10	BL 30	BL 50	BL 70	BL 100	
Arginina	79,54 $\pm$ 0,34 ^c	79,26 $\pm$ 0,88 ^c	81,58 $\pm$ 1,07 ^b	82,35 $\pm$ 0,81 ^{ab}	82,53 $\pm$ 0,25 ^{ab}	84,11 $\pm$ 0,45 ^a	
Fenilalanina	72,00 $\pm$ 0,47 ^c	73,15 $\pm$ 1,14 ^{bc}	73,94 $\pm$ 1,51 ^{abc}	76,50 $\pm$ 1,08 ^a	74,45 $\pm$ 0,36 ^{abc}	75,73 $\pm$ 0,69 ^{ab}	
Histidina	76,57 $\pm$ 0,39 ^b	79,10 $\pm$ 0,88 ^a	78,5 $\pm$ 1,24 ^{ab}	80,27 $\pm$ 0,90 ^a	79,16 $\pm$ 0,30 ^a	79,37 $\pm$ 0,58 ^a	
Isoleucina	76,81 $\pm$ 0,39 ^b	77,67 $\pm$ 0,94 ^{ab}	76,64 $\pm$ 1,35 ^b	79,61 $\pm$ 0,93 ^a	77,92 $\pm$ 0,31 ^{ab}	79,24 $\pm$ 0,59 ^a	
Leucina	76,50 $\pm$ 0,39 ^c	77,51 $\pm$ 0,95 ^{bc}	77,80 $\pm$ 1,28 ^{bc}	80,87 $\pm$ 0,87 ^a	78,30 $\pm$ 0,31 ^{bc}	79,35 $\pm$ 0,58 ^{ab}	
Lisina	83,96 $\pm$ 0,27 ^d	85,25 $\pm$ 0,62 ^{cd}	85,74 $\pm$ 0,82 ^{bc}	88,65 $\pm$ 0,52 ^a	85,92 $\pm$ 0,20 ^{bc}	86,95 $\pm$ 0,37 ^b	
Metionina	78,99 $\pm$ 0,35 ^a	78,93 $\pm$ 0,89 ^a	80,17 $\pm$ 1,15 ^a	70,17 $\pm$ 1,36 ^a	80,30 $\pm$ 0,28 ^a	79,52 $\pm$ 0,58 ^a	
Treonina	71,54 $\pm$ 0,48 ^b	73,02 $\pm$ 1,14 ^{ab}	73,68 $\pm$ 1,52 ^{ab}	75,51 $\pm$ 1,12 ^a	74,79 $\pm$ 0,36 ^a	75,04 $\pm$ 0,71 ^a	
Valina	69,19 $\pm$ 0,52 ^b	70,28 $\pm$ 1,26 ^b	70,24 $\pm$ 1,72 ^b	73,74 $\pm$ 1,20 ^a	70,91 $\pm$ 0,41 ^{ab}	73,80 $\pm$ 0,74 ^a	
<i>Aminoácidos não essenciais</i>							
Ác. aspártico	76,68 $\pm$ 0,39 ^d	79,14 $\pm$ 0,88 ^{bc}	81,02 $\pm$ 1,10 ^{ab}	77,11 $\pm$ 1,05 ^{cd}	81,70 $\pm$ 0,26 ^a	82,58 $\pm$ 0,49 ^a	
Ác. glutâmico	82,43 $\pm$ 0,30 ^b	83,36 $\pm$ 0,70 ^{ab}	84,14 $\pm$ 0,92 ^a	84,93 $\pm$ 0,69 ^a	84,30 $\pm$ 0,22 ^a	84,98 $\pm$ 0,42 ^a	
Alanina	78,13 $\pm$ 0,37 ^c	77,89 $\pm$ 0,93 ^c	79,23 $\pm$ 1,20 ^{bc}	81,44 $\pm$ 0,85 ^a	78,81 $\pm$ 0,30 ^{bc}	80,48 $\pm$ 0,55 ^{ab}	
Cistina	61,70 $\pm$ 0,64 ^c	69,42 $\pm$ 1,29 ^b	70,35 $\pm$ 1,71 ^{ab}	68,25 $\pm$ 1,45 ^b	69,76 $\pm$ 0,43 ^b	73,28 $\pm$ 0,76 ^a	
Glicina	75,08 $\pm$ 0,42 ^b	72,39 $\pm$ 1,17 ^c	75,96 $\pm$ 1,39 ^{ab}	77,49 $\pm$ 1,03 ^{ab}	75,64 $\pm$ 0,35 ^b	78,35 $\pm$ 0,61 ^a	
Prolina	77,05 $\pm$ 0,39 ^{bc}	75,70 $\pm$ 1,03 ^c	77,82 $\pm$ 1,28 ^b	80,45 $\pm$ 0,89 ^a	78,34 $\pm$ 0,31 ^b	81,36 $\pm$ 0,53 ^a	
Serina	68,07 $\pm$ 0,54 ^c	69,59 $\pm$ 1,29 ^{bc}	71,40 $\pm$ 1,65 ^{ab}	72,79 $\pm$ 1,24 ^a	72,49 $\pm$ 0,39 ^{ab}	73,80 $\pm$ 0,74 ^a	
Taurina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Tirosina	76,50 $\pm$ 0,39 ^a	77,11 $\pm$ 0,97 ^a	77,35 $\pm$ 1,31 ^a	68,32 $\pm$ 1,45 ^a	76,97 $\pm$ 0,38 ^a	78,85 $\pm$ 0,60 ^a	
AA totais	76,96 $\pm$ 0,39 ^a	77,58 $\pm$ 0,95 ^a	78,79 $\pm$ 1,23 ^a	79,63 $\pm$ 0,93 ^a	97,83 $\pm$ 0,03 ^a	80,58 $\pm$ 0,55 ^a	
Matéria seca	56,14 $\pm$ 0,74 ^a	55,21 $\pm$ 1,90 ^a	53,53 $\pm$ 2,69 ^a	53,32 $\pm$ 2,14 ^{ab}	49,24 $\pm$ 0,72 ^{bc}	47,59 $\pm$ 1,48 ^c	47,75 $\pm$ 4,46
Proteína bruta	75,21 $\pm$ 0,34 ^a	75,11 $\pm$ 2,52 ^a	75,88 $\pm$ 1,64 ^a	75,83 $\pm$ 1,14 ^a	75,63 $\pm$ 0,33 ^a	76,72 $\pm$ 0,21 ^a	67,16 $\pm$ 0,89
Energia bruta	71,53 $\pm$ 0,48 ^a	70,99 $\pm$ 1,23 ^{ab}	71,39 $\pm$ 1,65 ^a	67,93 $\pm$ 1,47 ^{bc}	65,54 $\pm$ 0,49 ^{cd}	63,71 $\pm$ 1,03 ^d	60,55 $\pm$ 3,37

ND - Não detectado nas fezes

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05)

4- Patente

4.1- Capítulo III (patente)

Ração para aquicultura contendo bioproduto composto por uma mistura de biofloco e levedura

Patente depositada no *Instituto Nacional de Propriedade Industrial- INPI*

(Número do Processo: BR 10 2017 022794 4)

As normas de redação deste capítulo atendem às exigências do INPI

RESUMO

“RAÇÃO PARA AQUICULTURA CONTENDO BIOPRODUTO COMPOSTO POR UMA MISTURA DE BIOFLOCO E LEVEDURA”. O presente pedido de patente de invenção trata do processo de obtenção de uma ração utilizando como principal ingrediente um bioproduto a base de farinha de biofloco e levedura que pode ser utilizado em substituição total à farinha de peixe. Ainda, outras farinhas de origem animal e vegetal misturadas como fonte de proteína, fontes de carboidratos como farinhas e farelos vegetais, fontes de lipídeos como óleo, aditivos como gelatina e goma de mandioca e suplementos alimentares como vitaminas e sais minerais. Um ensaio com as rações teste, empregadas na alimentação de indivíduos da espécie *Litopenaeus vannamei*, garantiu resultados equivalentes ou superiores, em termos de desempenho zootécnico, quando comparados com os camarões alimentados com uma ração comercial. Por possuir em sua composição a levedura, que atua como imunoestimulante garantiu também, taxas de sobrevivência mais elevadas para os indivíduos desta espécie alimentados com as rações que continham maior presença do bioproduto, também em comparação com uma ração comercial sendo de 92,44% para os grupos alimentados com a ração BL100 e 57,55% para os indivíduos alimentados com a ração comercial. A ração pode ser usada na área de aquicultura para a alimentação de peixes e camarões. A ração pode ser usada na área de aquicultura para a alimentação de peixes e camarões.

“RAÇÃO PARA AQUICULTURA CONTENDO BIOPRODUTO COMPOSTO POR UMA
MISTURA DE BIOFLOCO E LEVEDURA”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] O presente pedido de patente de invenção trata do processo de obtenção de uma ração utilizando como principal ingrediente um bioproduto a base de farinha de bioflocos e levedura que pode ser utilizado em substituição total à farinha de peixe. Por possuir em sua composição a levedura, que atua como imunoestimulante, garante taxas de sobrevivência mais elevadas dos organismos cultivados. A ração pode ser usada na área de aquicultura para a alimentação de peixes e camarões.

Antecedentes da invenção

[002] Ao longo de anos a crescente demanda de pescado pela população mundial vem sendo constatada, e este fato é caracterizado pela preocupação com hábitos alimentares mais saudáveis. O valor nutricional e a diversidade de produtos de origem aquática têm forte apelo na escolha de alimentos desta linha. Segundo dados da FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, 2016) o consumo aparente mundial de pescado por indivíduo aumentou de 9,9 kg na década de 1960 para 19,7Kg em 2013, com estimativas apontando para um aumento superior a 20kg em 2015. A crescente procura pelo pescado impulsiona a atividade da aquicultura de forma a atender a necessidade da população para estes produtos, porém fatores como a alimentação nos cultivos ainda são uma limitação, respondendo por gastos que variam de 50 a 70% do total investido nesta atividade.

[003] A alimentação é um dos fatores mais importantes que envolvem a aquicultura, garantindo melhores resultados de produção. Entretanto, ingredientes como a farinha de peixe, tipicamente utilizados em rações empregadas neste setor estão cada vez mais escassos devido a medidas de restrições na captura de algumas espécies, a questões climáticas e ao crescimento da aquicultura (FAO, 2016). Por possuir elevado teor proteico, perfil de aminoácidos e demais nutrientes adequados a espécies aquáticas a farinha de peixe acaba fazendo parte da formulação de rações

comercialmente produzidas. No entanto, devido à redução em sua oferta, perspectivas nada animadoras dão lugar à oportunidade do aproveitamento de outras fontes proteicas que possam vir a substituí-la, ainda que parcialmente, em dietas para organismos aquáticos. Neste âmbito, o aproveitamento de resíduos gerados pela própria aquicultura como fonte de nutrientes pode ser, além de uma saída para a problemática da escassez da farinha de peixe, uma solução para o descarte dos resíduos gerados de sistemas de cultivo superintensivos como o BFT.

[004] O crescente avanço da aquicultura acaba trazendo a necessidade de cultivos em altas densidades e a tendência de aumento de empreendimentos aquícolas superintensivos é inevitável. Este crescimento vem também acompanhado da preocupação com a finalidade dada à resíduos gerados em sistemas de cultivo como o BFT. O aproveitamento deste produto como fonte de proteína na alimentação dos próprios organismos cultivados acaba por tornar-se uma possibilidade concreta.

[005] *Biofloc Technology* ou simplesmente BFT é um sistema cujo principal intuito é a produção em altas densidades e a mínima utilização ou mesmo a anulação de trocas de água no cultivo. Neste tipo de sistema a geração de bactérias é induzida através de uma fonte de carbono para que estas mantenham a qualidade da água em níveis adequados aos organismos cultivados. Além das bactérias, fito e zooplâncton, partículas inorgânicas e detritos orgânicos compõem o bioflocos (Avnimelech Y., *Aquaculture*, 264, 140–147, 2007). Após avaliação do seu conteúdo nutricional, pesquisadores empregaram este resíduo na formulação de rações teste em substituição à farinha de peixe. Estas pesquisas obtiveram bons resultados nos índices de desempenho zootécnico dos animais alimentados com as rações contendo o bioflocos (Bauer et al., *Aquaculture*. 342-343, 112–116, 2012; Dantas Jr et al, *Aquac. Nutrition*. 22, 335-342, 2016; Valle et al., *Aquac. Nutrition*. 21, 105-112, 2015; KR 20150159755 A). Todavia, por ter um nível proteico que pode variar de 24 a 51% (Avnimelech Y., *The World Aquaculture Society*, 2009; Azim M.E. e Little D.C., *Aquaculture*. 283, 1-4, 29-35, 2008; Luo et al., *Aquac. Engineering*. 52, 73-79, 2013; Pérez-Fuentes et al., *Aquaculture*. 400-401, 105-110, 2013), a depender de sua composição, ainda não é possível que o bioflocos possa substituir sozinho a farinha de peixe em rações para a aquicultura. Deste modo, algo que associado ao bioflocos

conferisse o aumento no teor proteico, permitiria sua substituição pela farinha de peixe em níveis mais elevados.

[006] A levedura é um fungo unicelular que tem como característica nutricional níveis elevados de proteína, balanceado perfil de aminoácidos e ácidos graxos além de vitaminas do complexo B responsáveis por manter o equilíbrio da saúde animal (García-Galano, 2007; NRC, 2011). Estes microrganismos são bem conhecidos na produção de alimento humano e na aquicultura devido a resultados satisfatórios no desempenho zootécnico de algumas espécies após seu consumo. Ao avaliar a performance de crescimento de bagres da espécie *Clarias gariepinus*, alimentados com rações contendo níveis de 0; 10; 15 e 20 g/kg da levedura *S. cerevisiae*, Essa et al. (Aquaculture. 320, 137–141, 2011) observaram que os melhores resultados de taxa de crescimento, eficiência alimentar e sobrevivência foram para aqueles animais alimentados com a ração contendo o maior nível de inclusão da levedura. Já Iranshahi e colaboradores (J. Anim. Vet. Advances. 10, 2730-2735, 2011), ao alimentarem larvas de esturjões com *S. cerevisiae* via náuplios de *Artemia urmiana* notaram que estas apresentaram índices nos parâmetros de desempenho zootécnico significativamente superiores quando comparados ao tratamento controle. Em experimento testando um produto comercial à base de extrato de levedura, Berto et al. (Aquac. Research. 47, 1-11, 2016), detectaram o aumento de 28,8% no ganho de peso de juvenis de tilápia do Nilo. As leveduras podem ainda atuar como imunoestimulantes (US 2003/023239 A1; EP 1381345 B1; US 20040047881 A1), auxiliando no aumento da imunidade do animal quando ingerida.

[007] As leveduras não são habitantes normais do aparelho digestório e recentemente algumas cepas passaram a ser utilizadas como probiótico a partir da ingestão direta de células viáveis que estimulam a microbiota intestinal. Costa L.F. (Ver. Elet. Nutritime. 1, 01-06, 2004), afirma que por não serem hospedeiras naturais do trato gastrointestinal, as células das leveduras não aderem ao epitélio intestinal, multiplicando-se muito pouco e transitando juntamente com o bolo alimentar, atuando como probiótico, vindo a diminuir a pressão exercida pelos microrganismos patogênicos. As leveduras vivas através da capacidade de adsorverem bactérias Gram negativas impedem a ligação destas bactérias às vilosidades da mucosa intestinal.

[008] Algumas patentes descrevem métodos de utilização da levedura em rações para aquicultura como nos documentos EP 0332604 B1, US 5158788 A, WO 2004043139 A2. Estes documentos diferem da presente invenção, pois a levedura não é utilizada em associação com o biofloco como fonte de proteína.

[009] Alguns métodos também são empregados na produção da levedura que podem alterar ou melhorar sua função como descrito nas patentes US 5158788 A, o que pode vir a encarecer seu processo de produção diferentemente da levedura empregada no presente pedido de patente utilizada de forma íntegra, sem qualquer intervenção em sua estrutura física ou funções. A levedura íntegra utilizada na produção do bioproduto empregado nas rações produzidas apresenta um teor de proteína bruta de 71% contra 43,8% das leveduras cervejeiras (NRC, 1984) utilizadas na produção de rações.

[010] Ambos os ingredientes, biofloco e levedura, são utilizados na alimentação de organismos aquáticos, ainda que de forma experimental. Porém, a combinação destes ingredientes como um único produto ainda não havia sido relatada, tampouco seu emprego em rações em substituição à farinha de peixe.

Descrição da Invenção

[011] A presente invenção descreve um processo de produção de uma ração para a aquicultura composta por um bioproduto, outras farinhas de origem animal e vegetal como fonte de proteína, fontes de lipídeos como óleo, além de suplementos alimentares como vitaminas e sais minerais.

[012] A presente invenção descreve uma ração produzida com o bioproduto que pode ser usada na indústria de rações para camarões, tendo como vantagem a capacidade de substituir a farinha de peixe em até 100%, utilizar-se de um produto residual e ser composta por um microrganismo (levedura *Saccharomyces cerevisiae*) com alto teor proteico e excelente perfil de aminoácidos e que tem a capacidade de se ligar a microrganismos patógenos impedindo-os de colonizarem o trato gastrointestinal dos animais, atuando como imunoestimulante e garantindo assim a sanidade dos animais cultivados.

[013] Para fins desta invenção, o bioproduto é um ingrediente formado por uma farinha a base de biofloco e levedura *Sacharomyces cerevisiae*. Para fins desta invenção a medida de porcentagem (%) está relacionada à proporção do ingrediente dentro do total de ingredientes (100% - g/Kg). Para fins desta invenção, as rações serão apresentadas no Exemplo 1, com as notações BL0; BL10; BL30; BL50; BL70; BL90; BL100 referenciam a proporção de substituição da farinha de peixe pelo bioproduto em porcentagem (%). Sendo assim, a ração nomeada BL0 refere-se a uma ração sem a presença do bioproduto, que também é considerada aqui como a ração controle; BL10 com 10% de substituição da farinha de peixe pelo bioproduto; BL30 com 30% de substituição da farinha de peixe pelo bioproduto; BL50 com 50% de substituição da farinha de peixe pelo bioproduto; BL70 com 70% de substituição da farinha de peixe pelo bioproduto; BL90 com 90% de substituição da farinha de peixe pelo bioproduto; BL100 com 100% de substituição da farinha de peixe pelo bioproduto.

[014] Esta ração tem como fontes proteicas o bioproduto, farinhas de origem animal e vegetal tais como a farinha de vísceras de aves, farinha de camarão e farelo de soja, podendo a ração ser produzida com outras fontes proteicas de origem animal tais como a farinha de pena hidrolisada, farinha de lula, farinhas de subprodutos de carne ou de origem vegetal como a farinha de algodão. Com exceção do bioproduto, as farinhas e farelos são facilmente adquiridas no comércio.

[015] De acordo com a presente invenção, o bioproduto é gerado substituindo uma proporção compreendida entre 0,5 e 40%, preferencialmente 10% da farinha de biofloco pela levedura.

[016] A farinha de biofloco é produzida a partir do resíduo gerado em sistemas de cultivo aquícola do tipo BFT. Esta deve ser produzida conforme metodologia modificada de Valle et al. (*Aquaculture Nutrition*, 21.1 (2015): 105-112) que consiste na coleta do biofloco excedente dos sistemas de cultivo que pode ser através de sistemas de decantação. Para o produto utilizado no presente pedido de patente coletou-se o biofloco de tanques de cultivo do camarão marinho *L. vannamei* após atingir o volume de sólidos suspensos de 20 mL/L. Neste caso, a água do sistema é sugada para dentro de uma caixa com baixa turbulência, onde os sólidos decantados são coletados e filtrados em malhas de 250-10 µm. Após a filtração, a massa de

biofloco é disposta em camadas finas e mantida em área ventilada e protegida do sol. Logo após, o material deve ser espalhado com altura entre 1 mm e 5 mm, preferencialmente 3 mm, em bandejas e levado à estufa de circulação de ar forçado com temperatura de 45 a 60 °C, mas preferencialmente a 50 °C. Conduzido adequadamente de 24 – 72 h, mas preferencialmente 48 h. Após sua secagem, o biofloco é triturado e peneirado para uma granulometria entre 250-50 µm.

[017] A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode ser cultivada em caldo ou ágar YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) ou em caldo ou ágar Extrato de Levedura Triptona Soja. A levedura pode ainda ser cultivada em qualquer outro meio que permita seu crescimento em tempo e temperatura adequados à espécie. A cepa da levedura deve ser ativada em caldo YPD (composto de 1 g/kg de extrato de levedura, 1 g/kg de peptona e 2 g/kg de dextrose) e incubada a 27 °C por 48 h. Posteriormente, a suspensão da levedura deve ser inoculada em meio sólido YPD (diferenciado do caldo YPD pela inclusão de 23 g/kg de ágar). O crescimento deverá ocorrer entre 25-35 °C, preferencialmente 27 °C por 36-96 h, preferencialmente 72 h. Após este período, as leveduras crescidas são transferidas para caldo YPD, com concentração inicial de 10^7 UFC/mL (previamente avaliada). Depois de incubado em estufa de crescimento por tempo e temperatura sugeridos acima, a concentração pode chegar a 10^9 UFC/mL. O material deve ser homogeneizado, distribuído em recipientes próprios para centrifuga e centrifugado de 1000 a 5000 rpm por minuto, preferencialmente 3000 rpm por minuto durante 2-10 minutos, preferencialmente 5 minutos. O sobrenadante deve ser descartado e o decantado suspenso em água para remoção de resíduos do meio de cultura que é novamente centrifugado em mesma rotação e tempo sugeridos. O sobrenadante é descartado e o concentrado de células deverá ser convertido a pó por liofilização ou *spray drying*, por exemplo. É possível ainda, secar a levedura em estufa de recirculação de ar forçada antes da liofilização para reduzir o tempo deste processo. Para esta secagem sugere-se a altura da massa decantada entre 0,5 – 5 mm, preferencialmente 1 mm, temperatura de 45-60 °C, preferencialmente 50 °C, por 2-12 horas, preferencialmente 5 horas. Após a formação do pó com a levedura, esta é macerada ou triturada para ser incorporada à farinha de biofloco gerando o

bioproduto. O crescimento da levedura também é possível utilizando uma solução de água com alguma fonte de carbono como o açúcar ou o melaço, por exemplo.

[018] Os ingredientes que compõem o bioproduto, biofloco e levedura, apresentam teor de proteína bruta de 24,7% e 71%, respectivamente.

[019] As rações são formuladas de modo a serem isocalóricas e isoproteicas, com 40% de proteína bruta e atendem à necessidade nutricional de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* nas fases de pós-larva e engorda. No entanto, é possível utilizá-la também para camarões de outras espécies ou ainda para alguns tipos de peixes tal como a Tilápia (*Oreochromis niloticus*), Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e Zebrafish (*Danio rerio*) desde que obedecidas as necessidades nutricionais da espécie.

[020] As rações, objeto do pedido desta patente, estão formuladas considerando a substituição gradativa de 0% a 100% do total de farinha de peixe presente pelo bioproduto, preferencialmente 90%. A farinha de peixe comparece com 40% do total de ingredientes na ração basal ou ração controle e decresce gradativamente conforme o aumento na inclusão do bioproduto estando ausente na ração BL100. Tanto o bioproduto quanto a farinha de peixe representam as fontes proteicas mais expressivas da ração.

[021] Na presente invenção, o bioproduto contribui como fonte de proteína e compõe a ração em proporções que vão de 4 a 40% sempre substituindo a farinha de peixe. Também como fontes proteicas de origem animal tem-se a farinha de peixe, sendo utilizada de 0 a 40% do total de ingredientes da ração podendo, preferencialmente, ser utilizada em 4%. A farinha de vísceras de aves pode ser utilizada em concentrações entre 2% e 30%, preferencialmente 15%. A farinha de camarão também pode ser utilizada compreendida entre 1% e 12%, preferencialmente 6%. O farelo de soja como ingrediente proteico de origem vegetal é utilizado numa concentração que pode estar entre 5% e 23%, preferencialmente 21,5%. Ainda como ingredientes proteicos de origem vegetal tem-se o farelo de trigo com concentrações que podem variar de 4% a 15%, preferencialmente 6%, e a farinha de trigo podendo ser utilizada entre 4% e 20%, preferencialmente 6%, não restringindo o uso de outros farelos ou farinhas de origem vegetal tal como a farinha de milho.

[022] Algumas farinhas e farelos citados acima atual também como fonte de carboidratos e fibras.

[023] A fonte de lipídio aqui utilizada é o óleo de peixe, entre 0,5 e 4%, preferencialmente 1%, não estando a ração limitada apenas a esta fonte lipídica. É possível substituí-la ou associá-la a outros óleos de origem animal ou óleos de origem vegetal como os produzidos a partir de sementes de linhaça ou de girassol, óleo de soja, entre outros, desde que sejam comprovadamente eficientes para a nutrição do animal cultivado.

[024] Como aditivos presentes na composição da ração estão a gelatina e a goma de mandioca. A gelatina atuará como aglutinante e pode contribuir como fonte proteica podendo representar de 1% a 5% da ração, preferencialmente 3,5%. A goma de mandioca é adicionada para completar a proporção de ingredientes na formulação da ração e pode atuar como fonte de carboidrato e aglutinante sendo utilizada entre 0 e 10%. No caso de a ração ser produzida para o camarão, é opcional a adição deste ingrediente, visto que a goma de mandioca não possui nutrientes que possam contribuir à sua nutrição.

[025] A ração conta ainda um mix de vitaminas e minerais que compreende as vitaminas A, B1, B2, B6, B12, C, D3, E e K3, ácido fólico, pantotenato de cálcio, biotina, colina, ácido nicotínico (B3), ferro, cobre, manganês, zinco, iodo, cobalto e selênio. Este mix pode representar de 0,5 a 3% do total da ração, sendo preferencialmente utilizado 1%.

[026] Para a produção da ração com substituição da farinha de peixe pelo bioproduto, pode ser preparada triturando-se os ingredientes, quando necessário, ao tamanho de 100-500 μm , mas preferencialmente a 250 μm . Em seguida, misturam-se os ingredientes secos de maior volume, posteriormente incorporando os ingredientes secos de menor volume (micronutrientes), previamente misturados. Depois, deve-se acrescentar o óleo e água a 45 °C em volume entre 10% e 40% da quantidade total dos ingredientes da ração, preferencialmente 20% ou até que o produto gerado após a mistura seja uma massa uniforme capaz de ser moldada a mão sem excesso de líquido. Para rações com granulometrias pequenas, a massa produzida com a mistura dos ingredientes é espalhada com altura entre 2 e 5 mm, preferencialmente 3 mm, em

bandejas e acondicionada em estufa de recirculação de ar forçada com temperatura que pode variar de 45 a 60 °C, preferencialmente 50 °C para que seja seca. Este procedimento dura entre 5 e 12 horas, preferencialmente 8 horas. Em seguida, a ração, ainda com certa umidade, deve ser passada em peneiras com abertura de tela que gere grãos apropriados ao tamanho do animal cultivado. No caso de pós-larvas do camarão *L. vannamei* foram utilizadas telas com abertura de 0,85 mm, 1,4 mm e 2,0 mm. Em seguida, as rações voltam à estufa, para término de secagem, com temperatura de 45 a 55 °C, preferencialmente 50 °C, de 10 a 60 minutos, preferencialmente 30 minutos ou até que esteja completamente seca. Se a produção considerar indivíduos que se alimentem de pellets maiores, como 2,4 mm de diâmetro, abaixo ou acima disto, a massa produzida com a mistura dos ingredientes deve ser trabalhada, sem prévia secagem, em equipamentos próprios como peletizadoras ou extrusoras. Os pellets obtidos destes processos devem ser levados à secagem em estufa de recirculação de ar forçada, com temperatura compreendida entre 45 °C e 60 °C, preferencialmente 50 °C. O tempo será determinado pelo tamanho do pellet e sua distribuição nas bandejas de secagem.

Exemplo 1: Composições de rações contendo o bioproduto

[027] Os ingredientes utilizados na formulação foram os mesmos em todas as rações exceto nas rações controle (com ausência do bioproduto), BL90% (com ausência da goma de mandioca) e BL100% (com ausência da farinha de peixe e da goma de mandioca).

[028] Tabela 1: Quantidade dos ingredientes utilizadas na produção das rações contendo o bioproduto, tendo como ração basal ou controle a ração BL0.

INGREDIENTES (%)	Tratamentos						
	BL0	BL10	BL30	BL50	BL70	BL90	BL100
Farinha de peixe	40	36	28	20	12	4	0
Bioproduto	0	4	12	20	28	36	40
Farinha de vísceras	7	7	10	10	15	15	15
Farinha de camarão	4	4	5	5	6	6	6
Farelo de soja	9	9	10	17	19	21,5	21,5
Farelo de trigo	12	12	11	11	6	6	6
Farinha de trigo	20	20	15	10	7	6	5,5

Goma de mandioca	5	5	5	3	3	0	0
Gelatina	1	1	2	2	2	3,5	4
Óleo de peixe	1	1	1	1	1	1	1
Mix de vit. e minerais	1	1	1	1	1	1	1
Total	100	100	100	100	100	100	100

Exemplo 2: Uso da ração para alimentação de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*

[029] A composição nutricional das rações mostrou-se adequada à necessidade de camarões nas fases de pós-larva e juvenil. O equilibrado perfil de aminoácidos atende as necessidades da espécie avaliada para estes nutrientes de acordo com o NRC (2011). Deste modo, os testes com as rações foram aplicados em pós-larvas do camarão marinho *L. vannamei* em estágio de PL12 (com 12 dias na fase de pós-larva) com duração de 30 dias. Cada ração confeccionada (07 rações – Tabela 1) foi ofertada para 03 grupos de 150 camarões, totalizando 21 grupos. Existiu ainda uma avaliação externa que consistiu da alimentação de 03 grupos com ração comercial para posterior comparação. Todos os grupos foram alimentados três vezes ao dia nos horários das 08:00, 12:00 e 16:00 horas. Ao final do período estipulado para a avaliação, os camarões apresentaram resultados satisfatórios de desempenho zootécnico, sendo ora superior ora equivalente à ração comercial utilizada como controle externo. Observou-se ainda o aumento na taxa de sobrevivência dos grupos alimentados com as rações que continham maior quantidade do bioproduto quando comparados com os grupos alimentados com a ração comercial sendo de 92,44% para os indivíduos alimentados com a ração BL100 e de 57,55% para os alimentados com a ração comercial.

REIVINDICAÇÕES

1. “RAÇÃO PARA AQUICULTURA CONTENDO BIOPRODUTO COMPOSTO POR UMA MISTURA DE BIOFLOCO E LEVEDURA” **caracterizado por** ração consistindo de um bioproduto a base de farinha de bioflocos e levedura, outras farinhas de origem animal e vegetal misturadas como fonte de proteína, fontes de carboidratos como farinhas e farelos vegetais, fontes de lipídeos como óleo, aditivos como gelatina e goma de mandioca e suplementos alimentares como vitaminas e sais minerais.
2. “RAÇÃO PARA AQUICULTURA CONTENDO BIOPRODUTO COMPOSTO POR UMA MISTURA DE BIOFLOCO E LEVEDURA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** bioproduto conter em sua composição a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o bioflocos adquirido a partir de sistemas de cultivos do tipo Biofloc technology (BFT).
3. “RAÇÃO PARA AQUICULTURA CONTENDO BIOPRODUTO COMPOSTO POR UMA MISTURA DE BIOFLOCO E LEVEDURA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** bioproduto substituir a farinha de peixe em diferentes proporções em até 100%.
4. “RAÇÃO PARA AQUICULTURA CONTENDO BIOPRODUTO COMPOSTO POR UMA MISTURA DE BIOFLOCO E LEVEDURA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelas** outras fontes de proteína de origem animal compreenderem farinhas de peixe, de vísceras de ave, de camarão e gelatina e outras de origem vegetal compreenderem farelo e farinha de soja e de trigo.
5. “RAÇÃO PARA AQUICULTURA CONTENDO BIOPRODUTO COMPOSTO POR UMA MISTURA DE BIOFLOCO E LEVEDURA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelas** fontes de carboidrato compreenderem farinha e farelo de trigo.
6. “RAÇÃO PARA AQUICULTURA CONTENDO BIOPRODUTO COMPOSTO POR UMA MISTURA DE BIOFLOCO E LEVEDURA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pela fonte de lipídios compreender óleo de peixe.

7. “RAÇÃO PARA AQUICULTURA CONTENDO BIOPRODUTO COMPOSTO POR UMA MISTURA DE BIOFLOCO E LEVEDURA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pela** ração de acordo com sua granulometria variando de 0,85 a 2,40 mm suprir as necessidades do camarão nas fases pós-larva e juvenil e também ser utilizada para peixes.

5. Considerações finais

Estudos com a aplicação do residual de biofloco ganha importância à medida que cresce o número de empreendimentos que atuam na produção de pescado nestes sistemas. Dar finalidade a este resíduo é uma forma de auxiliar na sustentabilidade da atividade.

Os resultados obtidos com as pesquisas desta tese indicaram a possibilidade de substituição, ainda que parcial, da farinha e peixe pelo bioproduto de biofloco e levedura aqui proposto. Em relação ao desempenho zootécnico de pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* esta substituição pode ser aplicada em até 90% sem trazer qualquer prejuízo ao desempenho da espécie. No entanto, estudos posteriores de desempenho dos indivíduos em outras fases podem ser propostos para conhecimento de sua performance quando alimentados com a ração contendo o bioproduto.

Para o teste de digestibilidade em juvenis do *L.vannamei* o nível máximo indicado, para manter o equilíbrio entre as digestibilidades de proteína, matéria seca, e aminoácidos, foi de 50%. Já para o CDAEB a concentração indicada foi de até 30%. No entanto, estudos de digestibilidade das rações em outras fases da espécie podem ser propostos como forma de conhecer seu efeito ao longo do crescimento do animal.

Assim como para os camarões, a avaliação do bioproduto na alimentação de peixes também é uma alternativa, ampliando a possibilidade de aplicação para outras espécies.

Ensaio com a avaliação deste bioproduto relativo à sanidade também podem ser explorados, visto que diversas pesquisas com leveduras na aquicultura indicam seu potencial imunestimulante.

