



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

José Stênio Aragão Rebouças Júnior

**Bioativos vegetais amazônicos como estratégia imunonutricional na  
modulação da resposta ao WSSV em *Penaeus vannamei***

Florianópolis  
2026

José Stênio Aragão Rebouças Júnior

**Bioativos vegetais amazônicos como estratégia imunonutricional na  
modulação da resposta ao WSSV em *Penaeus vannamei***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Aquicultura da Universidade Federal de Santa  
Catarina como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor em Aquicultura e Recursos  
Pesqueiros.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciane Maria Perazzolo

Florianópolis

2026

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.  
Dados inseridos pelo próprio autor.

Rebouças Júnior, José Stênio Aragão  
Bioativos vegetais amazônicos como estratégia  
imunonutricional na modulação da resposta ao WSSV em  
*Penaeus vannamei*. / José Stênio Aragão Rebouças Júnior ;  
orientadora, Luciane Maria Perazzolo, 2026.  
102 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2026.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Imunoparâmetros. 3. fitoterápicos. 4.  
coprodutos. I. Perazzolo, Luciane Maria . II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Aquicultura. III. Título.

José Stênio Aragão Rebouças Júnior

**Bioativos vegetais amazônicos como estratégia imunonutricional na modulação da resposta ao WSSV em *Penaeus vannamei*.**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 24 de Fevereiro de 2026, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

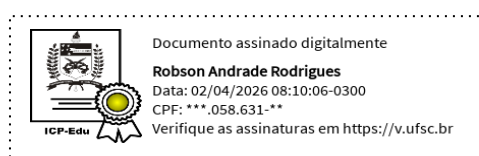
Prof<sup>a</sup>. Luciane Maria Perazzolo, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

César Marcial Escobedo Bonilla  
Instituto Politécnico Nacional, Guasave, México

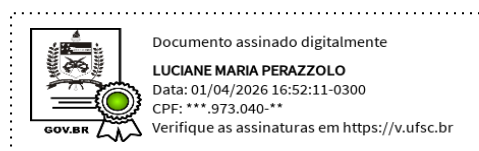
Prof. José María Monserrat, Dr.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Walter Quadros Seiffert, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutorado em Aquicultura e Recursos Pesqueiros.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof<sup>a</sup>. Luciane Maria Perazzolo, Dr<sup>a</sup>.  
Orientadora

Florianópolis, 2026

Dedico este trabalho aos meus amigos e minha amada família, que sempre me incentivaram e me apoiaram nos melhores e piores momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a diversas pessoas e instituições que desempenharam papéis fundamentais em minha jornada até aqui:

Aos meus pais, que sempre me ajudaram, fornecendo suporte emocional e financeiro quando mais precisei.

Ao Professor Rafael da Rosa, agradeço por toda os ensinamentos, explicações e sugestões valiosas durante a realização do experimento e análises.

À empresa Prospera Nutri®, que forneceu suporte financeiro para a execução construção dos aquários no laboratório.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Aquicultura, pelos ensinamentos e contribuições nos manuscritos ao longo das etapas de defesa.

À todos os amigos do Laboratório LIAA-UFSC, Luana, Cassia, Aletícia, Doris, Joana, Gustavo, as duas Beatriz, Juliana, Camila, Laura, Lara e em especial ao Abdon e Ediane, que ofereceram ajuda essencial durante a execução dos experimentos, além de momentos de alegria e descontração. Sem vocês não seria possível se quer gerenciar as biometrias e coletas de material biológico.

À prof<sup>a</sup> Juliane e a Larissa do Laboratório (FURG). À prof<sup>a</sup> Franceli e Sarah do Laboratório GBMaP-UFSC pela ajuda nas análises moleculares. Ao pesquisador Weber e Vitória do LABNUTRI-UFSC pela confecção das rações experimentais.

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

“Para ofender um homem forte, diga-lhe uma mentira. Para ofender um homem fraco, diga-lhe a verdade”.

(Autor Desconhecido)

## RESUMO

Fatores nutricionais desempenham papel central na modulação da imunocompetência, do equilíbrio redox e da resistência a patógenos em *Penaeus vannamei*, especialmente frente a infecções virais de alto impacto, como o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). O presente estudo avaliou os efeitos de dietas acrescidas com ingredientes vegetais de origem amazônica - farelos de buriti (*Mauritia flexuosa*), pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) e açaí (*Euterpe oleracea*) - sobre parâmetros hemato-imunológicos, bioquímicos e moleculares e sobre a resistência ao WSSV em camarões juvenis *Penaeus vannamei*. Dietas suplementadas com 4% ou 8% de farelo de buriti e pracaxi, bem como com 8% de farelo de açaí, foram testadas em diferentes ensaios experimentais. A suplementação com 8% de farelo de buriti destacou-se como a estratégia mais eficaz, promovendo aumento significativo da atividade da fenoloxidase, da concentração de proteínas séricas e da capacidade de aglutinação contra várias bactérias marinhas, além do fortalecimento das defesas antioxidantes, evidenciado por maior atividade da catalase, elevação dos níveis de glutathione reduzida e redução da peroxidação lipídica no hepatopâncreas. Esse perfil foi acompanhado pela expressão aumentada de genes associados às vias antimicrobianas, redox e antivirais (interferon-*like*), incluindo PPAE1, PPAE2, TGII, CAT, Vago4, Vago5 e STING, resultando em aumento significativo da sobrevivência dos camarões após desafio com WSSV. Em contraste, dietas suplementadas com farelo de pracaxi comprometeram o desempenho zootécnico e a sobrevivência dos camarões. A suplementação com 8% de farelo de açaí promoveu uma modulação seletiva do eixo imune-redox, caracterizada pela redução da expressão de DUOX1, aumento moderado da expressão de Pelle, STING e elevação da atividade da catalase e glutathione peroxidase, sem, contudo, conferir resistência à infecção sistêmica por WSSV. Em todos os tratamentos, a microbiota bacteriana intestinal manteve-se estável, confirmando a segurança das formulações dietéticas. Em conjunto, os resultados demonstram que ingredientes vegetais amazônicos apresentaram efeitos imunomodulatórios distintos e dependentes do perfil bioativo, sendo o farelo de buriti um promissor aditivo funcional capaz de promover resiliência imune e resistência antiviral, enquanto o farelo de açaí atua predominantemente na citoproteção redox e manutenção da homeostase fisiológica. Além do avanço científico, este estudo reforça o potencial de coprodutos amazônicos como insumos sustentáveis para a carcinicultura, alinhados aos princípios da economia circular e da bioeconomia marinha.

**Palavras-chave:** Aquicultura; Imunoparâmetros; fitoterápicos; coprodutos.

## ABSTRACT

Nutritional factors play a central role in modulating immunocompetence, redox balance, and resistance to pathogens in *Penaeus vannamei*, especially against high-impact viral infections such as white spot syndrome virus (WSSV). The present study evaluated the effects of diets supplemented with Amazonian plant ingredients - buriti (*Mauritia flexuosa*), pracaxi (*Pentaclethra macroloba*), and açai (*Euterpe oleraceae*) meal - on hematological, immunological, biochemical, and molecular parameters and on resistance to WSSV in juvenile *Penaeus vannamei* shrimp. Diets supplemented with 4% or 8% buriti and pracaxi meal, as well as 8% açai meal, were tested in different experimental trials. Supplementation with 8% buriti and pracaxi meal stood out as the most effective strategy, promoting a significant increase in phenoloxidase activity, serum protein concentration, and agglutination capacity against various marine bacteria, in addition to strengthening antioxidant defenses, evidenced by increased catalase activity, elevated levels of reduced glutathione, and reduced lipid peroxidation in the hepatopancreas. This profile was accompanied by overexpression of genes associated with antimicrobial, redox, and antiviral (interferon-like) pathways, including PPAE1, PPAE2, TGII, CAT, Vago4, Vago5, and STING, resulting in a significant increase in shrimp survival after challenge with WSSV. In contrast, diets supplemented with pracaxi meal compromised zootechnical performance and shrimp survival. Supplementation with 8% açai bran promoted selective modulation of the immune-redox axis, characterized by reduced expression of DUOX1, moderate increase in the expression of Pelle and STING, and increased catalase and glutathione peroxidase activity, without, however, conferring resistance to systemic infection by WSSV. In all treatments, the intestinal bacterial microbiota remained stable, confirming the safety of the dietary formulations. Together, the results demonstrate that Amazonian plant ingredients have distinct immunomodulatory effects depending on their bioactive profile, with buriti bran being a promising functional additive capable of promoting immune resilience and antiviral resistance, while açai bran acts predominantly in redox cytoprotection and maintenance of physiological homeostasis. In addition to scientific advancement, this study reinforces the potential of Amazonian co-products as sustainable inputs for shrimp farming, in line with the principles of the circular economy and marine bioeconomy.

**Keywords:** Aquaculture; Immunoparameters; Amazonia; phytotherapies; co-products.

## LISTA DE FIGURAS

**Figure 1.** Experimental design. Experiment 1: Selection of optimal dietary ingredient concentration: After a seven-day acclimation period, juvenile *P. vannamei* were fed for 30 days with either a control diet (C; Alcon® Shrimp Nano Sticks) or diets supplemented with buriti (B) or pracaxi (P) brans at 4% (B4, P4) or 8% (B8, P8). Hemolymph was collected for analysis of immunological parameters. Experiment 2: Evaluation of the immunoprotective effect of buriti supplementation: Dietary supplementation with either the control (C) or the buriti-supplemented diet (B8) was initiated on day 0 and continued for 20 days. On the 20<sup>th</sup> day, tissues were collected for hemato-immunological assessments, evaluation of hepatopancreas antioxidant capacity, and midgut molecular analyses (immune-related gene expression and bacterial quantification). On the 30<sup>th</sup> day, shrimp were challenged with WSSV (LD<sub>50/15</sub>), and survival was monitored until day 50.....37

**Figure 2.** (A) Shrimp hemato-immunological profile in experiment 2. Shrimp were fed with a control (C) or 8% buriti bran supplemented diet (B8) for 20 days. Immune parameters evaluated during the pre-challenge phase included total hemocyte count (THC), total serum protein concentration (PC), phenoloxidase activity (POA), and the agglutination capacity of hemolymph against marine Gram-positive bacteria *Microbacterium maritypicum* and *Corynebacterium stationis*, as well as Gram-negative bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi*, *V. nigripulchritudo*, and *V. parahaemolyticus*. Values are presented as mean ± SD (\*p < 0.05). (B) Kaplan–Meier survival plot of shrimp exposed to WSSV. On the 30<sup>th</sup> day of dietary supplementation, 15 shrimp from each group were challenged  $3 \times 10^3$  WSSV copies, and supplementation was maintained until the end of the experiment (day 50). .....45

**Figure 3.** Antioxidant capacity and lipid damage parameters in the hepatopancreas. Shrimp fed a basal diet (C; control) or diet supplemented with 8% buriti bran (B8) during 20 days. The analyses included levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total sulfhydryl groups (P-SH), and the enzymatic activity of glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and reduced glutathione (GSH). Values are presented as mean ± standard deviation. Significant differences between treatments (\*p < 0.05; \*\* p < 0.01). .....45

**Figure 4.** Heatmap showing the expression profiles of 42 immune-related genes in the midgut of *P. vannamei* fed for 20 days with either a non-supplemented control diet (C)

or a diet supplemented with 8% buriti bran (B8). Each cell represents the mean expression level of a specific gene based on three pooled samples per treatment. Color intensity (ranging from blue to red) reflects the magnitude of gene expression, as indicated by the color scale at the bottom right of the heatmap. (B) Differential expression of genes showing statistically significant transcriptional changes ( $\geq 2$ -fold change; unpaired Student's t-test,  $p \leq 0.05$ ) between the B8 and control (C) groups. Relative expression levels (B8/C) were calibrated to gene expression in the MG of shrimp fed the control diet. Functional gene categories are indicated by symbols next to each gene name.....47

**Figure 5.** (A) Absolute quantification of some bacterial groups in the MG of *P. vannamei* after 20 days of feeding with either a non-supplemented diet (C) or a diet supplemented with 8% buriti bran (B8). Values are expressed on a  $\text{Log}_{10}$  scale as 16S rRNA gene copies per ng of gDNA. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. (B) Relative abundance of the phyla Actinobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes, and the class Gammaproteobacteria in the shrimp MG. Percentages represent the proportion of 16S rRNA gene copies per ng of gDNA for each group. 49

**Figura 6.** Esquema do desenho experimental. ....71

**Figura 7.** Comparação dos parâmetros de capacidade antioxidante e dano lipídico do hepatopâncreas entre camarões alimentados com dieta basal (C) ou com adição de 8% de farelo de açaí (A8). As análises incluíram níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupos sulfidríla totais (P-SH), além da atividade enzimática da glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione reduzida (GSH). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. (\*) diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ). ....76

**Figure 8.** A: Expressão diferencial de genes que mostram alterações transcricionais estatisticamente significativas ( $\geq$  mudança 1,5 vezes; teste t-Student não pareado,  $p \leq 0,05$ ) entre os grupos A8 e controle (C). Os níveis de expressão relativa (A8/Controle) foram calibrados para a expressão gênica no MG de camarão alimentado com a dieta controle. Categorias funcionais de genes são indicadas por símbolos ao lado de cada nome de gene. B: Mapa de calor apresentando o perfil de expressão de 42 genes relacionados ao sistema imunológico no intestino médio de *P. vannamei* alimentado por 20 dias com uma dieta sem suplementação (C) ou com adição de 8% de farelo de açaí (A8). Cada célula na matriz representa a média de três conjuntos de níveis de expressão de um gene específico para uma condição

experimental. A intensidade da cor (do azul ao vermelho) indica a magnitude da expressão, com base na escala de cores no canto inferior direito do mapa de calor.

.....77

**Figure 9.** A: Quantificação absoluta de alguns dos grupos bacterianos mais abundantes no intestino médio de *P. vannamei* alimentado por 20 dias com uma dieta sem suplementação (C) ou com suplementação de 8% de farinha de açaí (A8). Os valores são expressos em uma escala de Log<sub>10</sub> como cópias do gene 16S rRNA por ng de gDNA. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão. B: Porcentagem da abundância relativa dos filos Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, e da classe Gammaproteobacteria no intestino médio dos camarões. Os valores percentuais referem-se ao número de cópias Log<sub>10</sub> do gene 16S rRNA por ng de gDNA para cada grupo.....78

**Figura 10.** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de camarões após infecção por WSSV.....79

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1.</b> Composition of the control and supplemented diets.....                                                                                                                                                                               | 35 |
| <b>Table 2.</b> Physico-chemical water parameters in tanks containing shrimp during Experiment 2 (mean $\pm$ SD). Shrimp were fed either a basal diet (C) or a diet supplemented with 8% buriti bran (B8).....                                       | 42 |
| <b>Table 3.</b> Hemato-immunological parameters in experiment 1. Shrimp were fed for 30 days with a control diet (C: Alcon® Shrimp Nano Sticks) or diets supplemented with buriti (B4, B8) or pracaxi (P4, P8) bran at 4% or 8% (mean $\pm$ SD)..... | 43 |
| <b>Tabela 4.</b> Formulação e composição da dieta basal e experimental. A quantidade de cada ingrediente é apresentada como valores percentuais (%) na composição úmida das dietas.....                                                              | 69 |
| <b>Tabela 5.</b> Parâmetros físicoquímicos da qualidade da água de <i>juvenis de P. vannamei</i> alimentados com dieta basal (C) ou 8% de farelo de açaí (A8). Dados sobre o Experimento 2. ....                                                     | 75 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|         |                                                                     |
|---------|---------------------------------------------------------------------|
| A8      | Ração suplementada com 8% de farelo de açaí                         |
| AMP     | <i>Antimicrobial peptides</i>                                       |
| B4      | Ração suplementada com 4% de farelo de buriti                       |
| B8      | Ração suplementada com 8% de farelo de buriti                       |
| C       | Ração controle                                                      |
| Cq      | Ciclo de quantificação                                              |
| DNA     | Ácido desoxirribonucleico                                           |
| IM      | Intestino médio                                                     |
| IMNV    | <i>Infectious myonecrosis virus</i>                                 |
| RNA     | Ácido ribonucleico                                                  |
| mRNA    | <i>Messenger RNA</i> , RNA mensageiro                               |
| PCR     | <i>Polymerase reaction chain</i>                                    |
| PO      | Fenoloxidase                                                        |
| proPO   | profenoloxidase                                                     |
| PRP     | Proteína de reconhecimento padrão                                   |
| P4      | Ração suplementada com 4% de farelo de pracaxi                      |
| P8      | Ração suplementada com 8% de farelo de pracaxi                      |
| pb      | Pares de base                                                       |
| RT-qPCR | <i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i> |
| WSSV    | <i>White spot syndrome virus</i>                                    |

## LISTA DE SIMBOLOS

|     |                |
|-----|----------------|
| mL  | mililitro      |
| μL  | microlitro     |
| g   | grama          |
| mg  | miligrama      |
| μg  | micrograma     |
| ng  | nanograma      |
| t   | toneladas      |
| μM  | micromolar     |
| h   | hora(s)        |
| min | minuto(s)      |
| s   | segundo(s)     |
| °C  | Graus Celsius  |
| ≤   | Menor ou igual |
| ≥   | Maior ou igual |
| %   | Porcentagem    |
| ±   | Mais ou menos  |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                         |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>                                                                                           | <b>17</b> |
| 1.1      | OBJETIVOS .....                                                                                                         | 27        |
| 1.1.1    | <b>Objetivo geral .....</b>                                                                                             | <b>27</b> |
| 1.1.2    | <b>Objetivos específicos .....</b>                                                                                      | <b>27</b> |
| 1.2      | ESTRUTURA DA TESE .....                                                                                                 | 28        |
| <b>2</b> | <b>ARTIGO CIENTÍFICO 1 .....</b>                                                                                        | <b>29</b> |
| 2.1      | INTRODUCTION.....                                                                                                       | 32        |
| 2.2      | MATERIAL AND METHODS.....                                                                                               | 34        |
| 2.2.1    | <b>Experimental feed design and composition .....</b>                                                                   | <b>34</b> |
| 2.2.2    | <b>Animals and experimental design .....</b>                                                                            | <b>36</b> |
| 2.2.3    | <b>Tissues collection .....</b>                                                                                         | <b>37</b> |
| 2.2.4    | <b>Hemato-immunological parameter assays .....</b>                                                                      | <b>38</b> |
| 2.2.5    | <b>Antioxidant capacity and lipid damage in the hepatopancreas .....</b>                                                | <b>39</b> |
| 2.2.6    | <b>Nucleic acid extraction and cDNA synthesis.....</b>                                                                  | <b>40</b> |
| 2.2.7    | <b>Fluorescence-based reverse transcription real-time quantitative PCR.....</b>                                         | <b>41</b> |
| 2.2.8    | <b>Absolute bacteria quantification in the midgut .....</b>                                                             | <b>41</b> |
| 2.3      | RESULTS .....                                                                                                           | 41        |
| 2.3.1    | <b>The water quality parameters remained stable .....</b>                                                               | <b>42</b> |
| 2.3.2    | <b>B8 diet improved same hemato-immunological responses in shrimp.....</b>                                              | <b>42</b> |
| 2.3.3    | <b>B8 diet enhances immunostimulatory response.....</b>                                                                 | <b>43</b> |
| 2.3.4    | <b>B8 Diet Enhances Antioxidant Defense and Reduces Lipid Peroxidation<br/>in Hepatopancreas .....</b>                  | <b>45</b> |
| 2.3.5    | <b>Dietary buriti bran enhances the expression of antiviral and immune<br/>effector genes in the shrimp midgut.....</b> | <b>46</b> |
| 2.3.6    | <b>Buriti bran supplementation preserves intestinal bacterial composition .....</b>                                     | <b>48</b> |
| 2.4      | DISCUSSION.....                                                                                                         | 50        |
| 2.5      | REFERENCES.....                                                                                                         | 56        |
| <b>3</b> | <b>ARTIGO CIENTÍFICO 2 .....</b>                                                                                        | <b>62</b> |
| 3.1      | INTRODUÇÃO .....                                                                                                        | 66        |
| 3.2      | MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                 | 68        |
| 3.2.1    | <b>Confecção e composição da dieta .....</b>                                                                            | <b>68</b> |

|              |                                                                                              |            |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>3.2.2</b> | <b>Animais e Desenho Experimental.....</b>                                                   | <b>70</b>  |
| <b>3.2.3</b> | <b>Coleta de tecidos .....</b>                                                               | <b>71</b>  |
| <b>3.2.4</b> | <b>Capacidade antioxidante e danos lipídicos no hepatopâncreas .....</b>                     | <b>72</b>  |
| <b>3.2.5</b> | <b>Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA.....</b>                                   | <b>73</b>  |
| <b>3.2.6</b> | <b>PCR quantitativa em tempo real por transcrição reversa baseada em fluorescência .....</b> | <b>73</b>  |
| <b>3.2.7</b> | <b>Quantificação absoluta de alguns grupos bacterianos no intestino médio.....</b>           | <b>74</b>  |
| <b>3.3</b>   | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                       | <b>75</b>  |
| <b>3.3.1</b> | <b>Parâmetros de qualidade da água .....</b>                                                 | <b>75</b>  |
| <b>3.3.2</b> | <b>A dieta A8 proporcionou um efeito antioxidante no hepatopâncreas..</b>                    | <b>75</b>  |
| <b>3.3.3</b> | <b>A dieta A8 modulou alguns genes relacionados ao sistema imune.....</b>                    | <b>76</b>  |
| <b>3.3.4</b> | <b>A dieta A8 não alterou a comunidade bacteriana no intestino médio..</b>                   | <b>78</b>  |
| <b>3.3.5</b> | <b>A dieta não alterou a sobrevivência frente ao WSSV .....</b>                              | <b>79</b>  |
| <b>3.4</b>   | <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                                       | <b>79</b>  |
| <b>3.5</b>   | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                                       | <b>85</b>  |
| <b>3.6</b>   | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                      | <b>86</b>  |
| <b>4</b>     | <b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>                                                                 | <b>92</b>  |
| <b>5</b>     | <b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL .....</b>                                                 | <b>94</b>  |
| <b>6</b>     | <b>APÊNDICES .....</b>                                                                       | <b>99</b>  |
| <b>7</b>     | <b>ANEXOS.....</b>                                                                           | <b>102</b> |

## INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento contínuo da população mundial tem sido acompanhado por uma demanda crescente por alimentos com alta qualidade proteica. Em escala global, a produção conjunta de pesca e aquicultura atingiu 223,2 milhões de toneladas em 2022, das quais 185,4 milhões de toneladas corresponderam a animais aquáticos e 37,8 milhões de toneladas a algas, estabelecendo um novo recorde e reforçando o papel central da aquicultura no suprimento de proteína de origem aquática (FAO, 2024). Nesse cenário, os crustáceos, em especial os camarões peneídeos, mantêm-se entre os grupos aquícolas de maior valor econômico. Estimativas recentes situam a produção global de camarão cultivado em aproximadamente 7,86 milhões de toneladas em 2024, enquanto que a produção brasileira obteve 146,8 mil toneladas segundo o IBGE (2024). A nível internacional, os cinco maiores produtores de camarão cultivado concentram-se principalmente na Ásia e na faixa Pacífico-América do Sul, com destaque para Equador, China, Índia, Vietnã e Indonésia (FAO, 2024). No Brasil, a carcinicultura apresenta forte concentração regional no Nordeste. Em 2024, o estado do Ceará respondeu por 57,1% da produção nacional, seguido pelo Rio Grande do Norte, com 21,5%, segundo a PPM/IBGE (2024).

O sucesso do cultivo do *P. vannamei* é devido às excelentes características zootécnicas, tais como: alta taxa de crescimento, fecundidade, robustez, tolerância à altas densidades e à variação de salinidade (BRIGGS, 2004). Entretanto, práticas de manejo inadequadas como baixa qualidade nutricional e da água, variações bruscas no pH, salinidade e temperatura levam a distúrbios na sua homeostasia, podendo ocasionar depleção no sistema imune, abrindo portas para o estabelecimento de enfermidades infecciosas.

Alterações nesta complexa relação propicia o surgimento de infecções nos cultivos. As doenças em sistemas de cultivos representam um dos maiores entraves, podendo ocasionar perdas econômicas relevantes, sendo um dos fatores mais limitantes ao sucesso da carcinicultura (ASCHE et al., 2021; KOOLOTH VALAPPIL; STENTIFORD; BASS, 2021). Os vírus e as bactérias são os microrganismos mais comuns com potencial patogênico para peneídeos, sendo os fungos e os parasitas, menos prejudiciais (FLEGEL, 2012, 2019). Os vírus de maior impacto na história da carcinicultura mundial são: o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV, do inglês: *White spot syndrome virus*), o vírus da cabeça amarela (YHV, do inglês: *Yellow Head*

*Virus*), o vírus da síndrome de Taura (TSV, do inglês: *Taura Syndrome Virus*), o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV, do inglês: *Infectious Myonecrosis Virus*), o vírus da necrose hematopoiética e hipodérmica infecciosa (IHHNV, do inglês: *Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus*) (LIGHTNER et al., 2012) e, mais recentemente, o Vírus Iridescente-1 de decápodos (DIV 1, do inglês: *Decapod Iridescent Virus 1*) (LIAO; HE; LI, 2022). Entre os mais mortais, destaca-se o WSSV que já ocasionou mortalidades de 100 % após 7 dias dos sinais iniciais registrados nos cultivos (KOU et al., 1998). O WSSV é capaz de causar infecções em todos os crustáceos da ordem Decapoda, infectando células de diversos tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica, com lesões descritas em epitélio branquial, cuticular, tecido hematopoiético, órgão linfóide, tecido nervoso, conjuntivo e epitélio intestinal, resultando em necrose disseminada dos sistemas digestivo, respiratório e excretor. A infecção pelo WSSV pode ocorrer por diferentes vias de entrada no hospedeiro, incluindo a via oral, associada à ingestão de material contaminado e infecção pelo trato digestório (THUONG et al., 2016; ESCOBEDO-BONILLA et al., 2007), tegumentar, envolvendo epitélios como cutícula e brânquias (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2007), e também através da glândula antenal (LIU et al., 2021), órgão excretor responsável pela filtração da hemolinfa (DE GRUYSE et al., 2020). Nesse contexto, partículas virais presentes na água podem ser capturadas durante os processos de osmorregulação, permitindo o acesso do vírus aos tecidos epiteliais associados à glândula e sua posterior disseminação sistêmica. Essa via de infecção reforça a elevada capacidade de transmissão do WSSV em sistemas aquícolas, especialmente em condições de alta carga viral no ambiente (ESCOBEDO-BONILLA et al., 2008). Já, entre as doenças causadas por bactérias, destacam-se as vibrioses, como a Doença da Necrose Hepatopancreática Aguda (AHPND, do inglês: *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*), causada por várias cepas virulentas de *Vibrio* spp., especialmente *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* (KONDO; VAN; DANG, 2015; TRAN et al., 2013).

Para se defender dos patógenos, os crustáceos contam apenas com um sistema imune do tipo inato, composto por moléculas dissolvidas no plasma e várias reações celulares de defesa, especialmente associadas à hemolinfa. Como todos os invertebrados, não possuem sistema imune adaptativo que é composto por células linfocíticas clonais (linfócitos T e B), anticorpos e memória imunológica a longo prazo (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). O sistema circulatório dos crustáceos é

aberto ou semi-aberto e seus tecidos são banhados pela hemolinfa, análoga ao sangue dos vertebrados. A imunidade associada à hemolinfa é dita “imunidade sistêmica” sendo diretamente dependente da ação dos hemócitos ou células imunocompetentes (existem três tipos: hialinos, semigranulares e granulares) e de moléculas dissolvidas no plasma, que constituem os fatores humorais (BACHÈRE et al., 2004; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Assim, respostas sistêmicas de defesa dos camarões compreendem uma atuação sinérgica entre os mecanismos celulares (fagocitose, nodulação, encapsulamento e produção de espécies reativas de oxigênio) e as respostas humorais que ocorrem no plasma.

Entre os mecanismos atualmente reconhecidos em crustáceos associados ao reconhecimento e destruição de patógenos, destacam-se: (1) reconhecimento do não-próprio por receptores/proteínas de reconhecimento-padrão (PRRs/PRPs); (2) ativação de vias de sinalização intracelular; (3) fagocitose, encapsulamento e nodulação, associadas à formação de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos (ETOs); (4) produção de moléculas microbidas, como as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e os peptídeos antimicrobianos (PAMs); (5) melanização mediada pelo sistema de ativação da pró-fenoxidase (proPO), gerando moléculas intermediárias altamente microbidas e citotóxicas; (6) coagulação da hemolinfa mediada por proteínas de coagulação e transglutaminases; (7) reconhecimento e aglutinação celular mediada por aglutininas/lectinas e, (8) defesa antiviral mediada pela interferência por RNA (RNAi), citocinas *interferon-like*, apoptose e autofagia (LIU et al. 2020; CERENIUS and SÖDERHÄLL, 2021; GONG and ZHANG, 2021; KULKARNI et al., 2021; MATOS et al., 2023).

A primeira barreira de proteção dos crustáceos contra a entrada de patógenos é proporcionada por uma carapaça externa rígida (exoesqueleto), que também reveste internamente o trato digestório. Além disso, o trato digestório secreta enzimas e moléculas, algumas com atividade antimicrobiana (SOONTHORNCHAI et al., 2010). Uma vez rompidas às barreiras físico-químicas, os microrganismos adentram a hemocele e desencadeiam a ativação de uma série de reações imunológicas sistêmicas no hospedeiro, visando neutralizar e eliminar os agentes invasores. Tais repostas são decorrentes do reconhecimento inicial do invasor pelas proteínas (PRPs, *Pattern Recognition Receptors*) presentes no plasma ou na superfície das células do hospedeiro. Estas moléculas imobilizam os microrganismos ligando-se aos seus

padrões moleculares associados a patógenos/microorganismos (M/PAMPs, *microorganism/pathogen associated molecular patterns*).

Entre os mecanismos acima citados, destacam-se as respostas antimicrobianas mediadas pela enzima fenoloxidase (PO) e pelos peptídeos antimicrobianos (PAMs). As fenoloxidasas dos decápodos estão envolvidas tanto na melanização da cutícula, quanto na esclerotização da carapaça, após injúrias no tecido. Durante a ativação do sistema de ativação da profenoloxidase (proPO, forma zimogênica da PO) há a produção de diferentes moléculas citotóxicas com alto poder microbida e citotóxico (PERAZZOLO; BARRACCO, 1997; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Por essa razão, essas moléculas são consideradas mecanismos antimicrobianos potentes nos camarões, sendo sua ativação monitorada a nível laboratorial para avaliar as condições imunológicas dos animais nos cultivos.

Estudos recentes têm voltado à atenção para uma imunidade extra-hemocitária nos camarões, associada aos epitélios, como àqueles presentes no intestino (FARIAS et al., 2019; GAGLIARDI et al., 2020; SILVEIRA et al., 2018). O trato gastrointestinal dos camarões é dividido em quatro áreas funcionais: intestino anterior (incluindo a boca, esôfago e estômago), hepatopâncreas, intestino médio e intestino posterior (SOONTHORNCHAI et al., 2010). A maioria do intestino é revestido por uma cutícula quitinosa que separa o conteúdo luminal do epitélio. A exceção é a região medial do intestino revestida apenas por uma membrana peritrófica quitinosa, acelular e porosa, que permite a absorção seletiva de nutrientes, sendo composta por fibrilas associadas às glicoproteínas e proteoglicanos (MCGAW; CURTIS, 2012; SOONTHORNCHAI et al., 2015). Os camarões apresentam hábitos de canibalismo e, assim, podem infectar-se ao ingerirem tecidos de camarões moribundos ou mortos que estejam infectados. Assim, a via oral ou *per os* é uma importante forma de infecção dos animais em viveiros e da transmissão horizontal de doenças nos cultivos {Formatting Citation}.

O bacterioma intestinal dos crustáceos configura-se como uma comunidade bacteriana funcional estreitamente integrada aos eixos de nutrição, imunidade e desempenho em sistemas intensivos de cultivo (PILOTTO et al., 2018; Do NASCIMENTO et al., 2024). No intestino médio, atua como principal superfície absorptiva e como uma das principais portas de entrada para patógenos como WSSV e *Vibrio spp.* Essa microbiota contribui para a digestão de nutrientes, a produção de metabólitos bioativos e a manutenção de uma barreira competitiva contra microorganismos oportunistas (ZENG et al., 2017; HOLT et al., 2021).

Em peneídeos, tem sido demonstrado que alterações na composição e na diversidade dessa comunidade bacteriana (disbiose) se associam a menor crescimento e maior incidência de enfermidades emergentes, o que é compatível com a ideia de que o bacterioma intestinal representa componente central do “tônus imunológico” basal dos camarões (HOLT, et al., 2021; XIONG, 2018; XIONG; SHA; CHEN, 2024; ZENG et al., 2024). Fatores como o sistema de cultivo, a qualidade da água, diferentes estressores ambientais e, de forma destacada, a dieta modulam esse equilíbrio ecológico, influenciando tanto a estrutura das comunidades bacterianas quanto a expressão de genes imunes no intestino médio (ZHANG et al., 2014; PILOTTO, 2019).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a estudar a imunidade associada ao intestino de *P. vannamei*. Estudos iniciais descreveram o perfil, ao longo do trato gastrointestinal, de transcritos associados ao sistema imune sugerindo assim, a participação dos hemócitos na defesa intestinal, caracterizando uma integração entre a imunidade sistêmica e a imunidade epitelial (SILVEIRA et al., 2018). Adicionalmente, foram conduzidos estudos acerca da modulação do perfil transcricional no intestino médio dos camarões cultivados em diferentes sistemas de cultivo (água verde, tecnologia em bioflocos sistemas heterotróficos e quimioautotróficos) (PILOTTO et al., 2020; DO NASCIMENTO et al., 2024) ou recebendo dieta enriquecida com extratos de cianobactérias *Arthrospira platensis* (PILOTTO et al., 2019). Mais recentemente, foram descritos padrões espaciais de expressão gênica no intestino médio, com a porção anterior destacada como importante sítio de expressão de moléculas antimicrobianas, além da identificação de um conjunto de genes preferencialmente expressos no intestino, candidatos a assinatura transcricional da imunidade intestinal mediante infecção oral pelo WSSV (GAGLIARDI, 2020).

Considerando que a vacinação clássica, baseada na imunização por anticorpos, não possa ser realizada em invertebrados, a busca por substâncias que estimulem ou aumentem a imunocompetência dos camarões e promovam a melhora nas suas condições gerais de saúde são de extrema relevância e urgência para a carcinicultura. Vários reportes na literatura abordam o uso de diferentes compostos oriundos de plantas, algas, fungos e microrganismos como substâncias imunoestimulantes para camarões (GHOSH; PANDA; LUYTEN, 2021), administrados na forma de injeção, imersão ou suplementação alimentar. A suplementação alimentar

representa a forma mais adequada, uma vez que permite o tratamento simultâneo de um grande número de animais e não induz estresse adicional (SMITH; BROWN; HAUTON, 2003); contudo, sua aplicação prática depende da reformulação ou adaptação das rações comerciais pelos produtores, o que pode representar um desafio operacional em sistemas intensivos de cultivo

Há vários estudos que relatam os efeitos de diferentes substâncias empregadas como imunoestimulantes, com capacidade de ativar ou intensificar mecanismos efetores da imunidade inata, ou imunomoduladores, que atuam diretamente na regulação da transcrição de genes associados às vias de defesa do hospedeiro em camarões marinhos. (EKASARI et al., 2014; KIM et al., 2014; PILOTTO et al., 2019). Imunoestimulantes são compostos naturais ou sintéticos que modulam as atividades do sistema imune, estimulando a ação de células imunocompetentes e/ou atuando a nível de expressão de genes associados ao sistema imune (GHOSH; PANDA; LUYTEN, 2021; MAQSOOD et al., 2011). Um organismo imunocompetente tem maior capacidade de resistir a infecções virais, bacterianas e fúngicas.

Nesse sentido, o uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças está relacionado à própria evolução humana e a fitoterapia pode ser estendida para o uso veterinário, como alternativa ao uso de quimioterápicos. As plantas medicinais têm contribuído fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio do isolamento e identificação de seus metabólitos secundários. Estes são conhecidos por atuar direta ou indiretamente através de vários alvos moleculares e celulares (CALIXTO, 2005).

Dito isso, entre as substâncias com potencial para suplementação alimentar visando melhorar a imunocompetência dos camarões frente às viroses e bacterioses, destacam-se plantas de origem no bioma amazônico, como o buriti, o açaí e o pracaxi. O perfil fitoquímico singular destes frutos é caracterizado pela elevada concentração de carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides, tocoferóis e ácidos graxos bioativos, moléculas reconhecidas por suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e imunomodulatórias (BOLIVAR-RAMIREZ et al 2022; RAMOS-ESCUDEIRO et al., 2022; ZHANG et al 2021). Ademais, apresentam potencial de aproveitamento sustentável de recursos regionais ainda pouco explorados na carcinicultura.

O buriti (*Mauritia flexuosa*) (Arecaceae) é uma palmeira nativa da Amazônia peruana, de ocorrência em toda região amazônica, incluindo o Brasil, que é muito

utilizada em fármacos, cosméticos e na indústria alimentar. O fruto do buriti é rico em ácidos graxos, carotenoides (principalmente o  $\beta$ -Caroteno), flavonoides, ácido ascórbico, além de possuir diversos tipos de antioxidantes e vitaminas A, complexo B, cálcio e ferro (RAMOS-ESCUADERO et al., 2022). Na literatura mundial atual, há apenas dois registros científicos avaliando a suplementação alimentar com buriti para camarões, sendo que nenhum deles aborda aspectos de sanidade ou imunidade. Dietas suplementadas com polpa de buriti (até 10%) resultam em aumentos na quantidade de carotenoides, flavonoides no hepatopâncreas e músculo, além de melhorar a capacidade antioxidante em *P. vannamei* (SIMIÃO et al., 2020).

No Brasil, são descritas três espécies do gênero *Euterpe* popularmente conhecidas como açaí (*Euterpe* sp, *E. precatoria* e *E. edulis*). As duas espécies de ocorrência no bioma amazônico são o açaí-de-touçeira ou açaí-do-pará (*E. oleracea* Mart.) caracterizado pelo perfilhamento, a precocidade e a produção contínua ao longo do ano, e o açaí-da-mata ou açaí-do-amazonas, oriundo da Amazônia Ocidental (*E. precatoria*), que se caracteriza pelo estirpe único, sem perfilhamento, e produção principalmente no inverno amazônico, além de demora para entrada em produção (Yamaguchi et al., 2015). O açaí *E. edulis*, ou juçara, tem ocorrência no Sul do Brasil também chamada de "açaí da Mata Atlântica". Nativa desse bioma, ela se estende desde o Nordeste até o Rio Grande do Sul.

Todas as espécies de açaí são reconhecidas pelo elevado valor energético em função do alto teor lipídico, sendo ainda fonte relevante de fibras e minerais, além de uma complexa fração polifenólica dominada por antocianinas, flavonas, flavonóis, ácidos fenólicos e pró-antocianidinas (RODRIGUES et al., 2006; PACHECO-PALENCIA; DE SOUZA SILVA et al., 2023). A combinação desses compostos está associada a propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, descritas em diferentes modelos biológicos. Entre os pigmentos majoritários, destacam-se os carotenoides, a exemplo do  $\beta$ -caroteno e antocianinas como cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo, responsáveis tanto pela coloração púrpura intensa do fruto quanto por seu elevado potencial de sequestro de espécies reativas de oxigênio (SCHAUSS et al., 2006; DE SOUZA SILVA et al., 2023).

Já, a árvore do pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) (Willd.) Kuntze (Fabaceae) é uma leguminosa de grande porte, de ocorrência na América latina, em especial na região amazônica, cuja importância social e econômica nos setores de alimentação, cosméticos e farmacológicos é muito relevante. O fruto do pracaxi possui sementes

comestíveis ricas em óleos (45 a 48 %) e que contêm alta estabilidade físico-química devido à alta concentração de compostos fenólicos (DOS SANTOS et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2020). O fruto é utilizado na indústria farmacêutica por possuir propriedades cicatrizantes em camundongos diabéticos e úlceras em humanos diabéticos (SIMMONS; BANOVA; BANOVA, 2015), além de seu extrato possuir saponinas triterpênicas com propriedades larvicidas contra *Aedes aegypti* (SANTIAGO et al., 2005). Nenhum relato de suplementação alimentar com pracaxi para animais aquáticos está disponível na literatura.

A composição química de subprodutos vegetais oriundos do processamento de frutos tropicais, como o açaí, o buriti e o pracaxi difere substancialmente da fração tradicionalmente consumida, em função das transformações ocorridas ao longo da cadeia produtiva. De modo geral, enquanto as porções comestíveis desses frutos são reconhecidas pelo elevado valor energético e pela presença de compostos bioativos, os subprodutos gerados após o despulpamento e/ou a extração de óleo apresentam alterações em sua composição proximal, com redução relativa do teor lipídico e aumento da fração fibrosa. Essas mudanças refletem a natureza dos processos tecnológicos aplicados e resultam em matrizes com características nutricionais e funcionais distintas, ampliando o potencial de utilização desses materiais em aplicações biotecnológicas e na formulação de ingredientes funcionais (DA COSTA, 2021; MELO et al., 2012; PEREIRA-FREIRE et al., 2022).

Compostos como flavonoides, taninos, saponinas, catequinas, quercetinas, alcaloides, antocianinas entre outros estão presentes em diferentes concentrações, nesses frutos (DOS SANTOS COSTA et al., 2014; RAMOS-ESCUADERO et al., 2022; TEIXEIRA et al., 2020). Estes compostos também presentes em outras plantas, já foram avaliados como compostos bioativos (isolados) na suplementação alimentar de crustáceos decápodos, sendo que alguns estudos relatam aumento de sobrevivência nas infecções virais (ZHANG et al 2021) e bacterianas (BOLIVAR-RAMIREZ et al 2022). Sendo assim, não há registros na literatura, até o momento, de estudos sobre o efeito da suplementação alimentar com açaí, pracaxi ou buriti (ou seus compostos isolados) sobre a imunocompetência e resistência de *P. vannamei* frente a infecções virais. Estudos desta natureza poderiam contribuir para o controle e prevenção de enfermidades nos cultivos.

Além do avanço no conhecimento imunológico aplicado à carcinicultura, a prospecção de ingredientes oriundos da biodiversidade amazônica dialoga

diretamente com os princípios da economia circular e com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU). Dentro dos objetivos da ODS podemos destacar a reutilização e o aproveitamento de subprodutos agro-extrativistas, como o farelo de frutos amazônicos obtido após o despulpamento do fruto e a prensagem a frio para extração do óleo, etapa que gera um material remanescente ainda com fração lipídica residual e passível de trituração para uso em alimento aquícola. A reutilização de subprodutos da indústria pode reduzir desperdícios, agregar valor às cadeias produtivas locais e promover soluções alinhadas a uma aquicultura ambientalmente responsável, em consonância com diretrizes da Amazônia Azul e da economia circular sustentável.

Nesse contexto, o presente estudo propôs avaliar o efeito da suplementação alimentar de camarões de juvenis *P. vannamei* com dietas acrescidas de farelo de açaí, buriti ou de pracaxi, em diferentes concentrações (4 ou 8%), sobre a sua imunocompetência, e o efeito protetor contra infecções pelo WSSV. Para tal, o trabalho foi estruturado em dois estudos independentes. No primeiro, foram avaliados os efeitos da suplementação com farelo de buriti (*Mauritia flexuosa*) e pracaxi (*Pentaclethra macroloba*), nas concentrações de 4% e 8%, ao longo de 30 dias, sendo a imunocompetência dos camarões analisada por meio de parâmetros hemato-imunológicos, expressão de genes relacionados à resposta imune, além de análises bioquímicas da capacidade antioxidante do hepatopâncreas. Adicionalmente, investigou-se a modulação de grupos bacterianos no intestino médio e a resistência dos animais frente ao desafio com WSSV, por meio da taxa de sobrevivência. Em um segundo estudo, avaliou-se o efeito da suplementação com 8% de farelo de açaí (*Euterpe oleracea*), sob delineamento experimental semelhante, com ênfase na análise de parâmetros antioxidantes, expressão gênica associada à imunidade e quantificação de grupos bacterianos intestinais. O potencial imunoprotetor dessa dieta também foi determinado por meio da sobrevivência dos camarões após desafio sistêmico com WSSV.

Considerando o potencial de compostos bioativos de espécies vegetais amazônicas na modulação da resposta imune, torna-se relevante investigar sua aplicação na carcinicultura, especialmente em espécies de interesse econômico como *Penaeus vannamei*. Estudos voltados ao uso de ingredientes funcionais na alimentação de camarões têm se mostrado promissores na melhoria da imunocompetência e na resistência a patógenos virais, como o vírus da síndrome da

mancha branca (WSSV). Assim, a compreensão dos efeitos de subprodutos vegetais, como açaí, buriti e pracaxi, sobre parâmetros imunológicos e sanitários pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo alimentar, com potencial impacto na prevenção de enfermidades e na produtividade do setor.

## OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de dietas suplementadas com farelo de açaí, buriti ou pracaxi sobre a imunocompetência de camarões juvenis *Penaeus vannamei*, bem como o seu efeito protetor contra infecções pelo WSSV.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar as melhores concentrações de suplementação nas rações (4% ou 8% de farelo de buriti e pracaxi) capaz de induzir imunocompetência nos camarões;
- b) Avaliar a imunocompetência dos animais alimentados com dieta suplementada (4% ou 8% de farelo de buriti ou pracaxi), desafiados, por meio do hemograma (contagem total), atividade da fenoloxidase, concentração de proteínas totais do soro e título aglutinante da hemolinfa;
- c) Avaliar o estado redox do hepatopâncreas de juvenis de *P. vannamei* alimentados com dietas suplementadas com farelo de açaí (8%) ou buriti (8%), por meio das atividades de CAT, SOD, GST e dos marcadores GSH, P-SH e TBARS.
- d) Identificar diferenças no perfil transcricional de cerca de 42 genes associados ao sistema imune no intestino médio (IM) dos animais alimentados com dietas suplementadas com farelo de açaí (8%) ou buriti (8%);
- e) Realizar a quantificação absoluta (número de cópias do gene 16S rRNA) dos grupos bacterianos (filos Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes e da classe Gammaproteobacteria) no IM dos animais;
- f) Avaliar o efeito das dietas suplementadas com farelo de açaí (8%) ou buriti (8%), na sobrevivência dos camarões alimentados por 30 dias, após, desafiados com o WSSV.

## ESTRUTURA DA TESE

Essa tese foi estruturada em três capítulos, organizados da seguinte forma:

### **Capítulo 1:** Introdução Geral

**Capítulo 2:** Artigo científico 1 intitulado “*Amazonian buriti and pracaxi as potential functional feed additives to improve shrimp immunity and resistance to WSSV*”. Esse artigo foi publicado no periódico *Fish and Shellfish Immunology*, em Setembro de 2025. (<https://doi.org/10.2139/ssrn.5275005>).

**Capítulo 3:** Artigo científico 2 intitulado “Dietary açai meal supplementation promotes selective immune–redox modulation and physiological balance in *Penaeus vannamei*”. Esse artigo será submetido ao periódico *Aquaculture International* (<https://link.springer.com/journal/10499>; Fator de Impacto 2.7).

## ARTIGO CIENTÍFICO 1

Neste capítulo será apresentado o estudo referente à modulação do sistema imune de camarões juvenis *Penaeus vannamei*, mediante a suplementação alimentar com dietas acrescidas de aditivos alimentares à base de farelo de duas plantas amazônicas, buriti (*Mauritia flexuosa*) e pracaxi (*Pentaclethra macroloba*). Os camarões foram alimentados por até 30 dias com uma das dietas suplementadas com 4% ou 8% de cada ingrediente e sua imunocompetência avaliada por meio de parâmetros hemato-imunológicos, expressão de genes associados à imunidade e análises bioquímicas da capacidade antioxidante do hepatopâncreas. Além disso avaliou-se a plasticidade de cinco principais grupos bacterianos no intestino médio dos camarões e a sua resistência frente a um desafio pelo WSSV, por meio da taxa de sobrevivência. Os resultados deste estudo foram publicados em Setembro de 2025, no periódico *Fish and Shellfish Immunology* (<https://doi.org/10.2139/ssrn.5275005>).

**Amazonian buriti and pracaxi as potential functional feed additives to  
improve shrimp immunity and resistance to WSSV**

José Stênio A. Rebouças, Abdon O. Vieira<sup>1</sup>, Ediane M. Rubas<sup>1</sup>; Doris S. M. Souza<sup>1</sup>, Franceli R. Kulcheski<sup>2</sup>, Larissa Müller<sup>3</sup>, Vitória D. de Oliveira<sup>4</sup>, Juliane Ventura Lima<sup>3</sup>, Felipe W. Mendonça<sup>5</sup>, Rafael D. Rosa<sup>1</sup>, Luciane M. Perazzolo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Applied Immunology in Aquaculture, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88035-972 Florianópolis, SC, Brazil

<sup>2</sup> Group of Plant Molecular Biology, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88035-972, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>3</sup> Institute of Biological Sciences, Federal University of Rio Grande, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

<sup>4</sup> Laboratory of Nutrition of Aquatic Species, Department of Aquaculture, Federal University of Santa Catarina, 88035-972, Florianópolis, Brazil.

<sup>5</sup> Prospera Nutrição & Consultoria LTDA, Avenida Campeche 2930, Unidade 203, 88063-301, Florianópolis, SC, Brazil

\* Corresponding author: Tel: +55 48 48 37 3721 4196; Fax: +55 48 48 3721 5528  
E-mail: l.m.perazzolo@ufsc.br (L.M.Perazzolo).

## Abstract

Environmental and nutritional factors are critical in modulating the immune system of *Penaeus vannamei*, particularly under viral threats such as white spot syndrome virus (WSSV). This study evaluated the effects of two Amazonian plant-based feed additives, buriti (*Mauritia flexuosa*) and pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) brans, on shrimp immune competence, oxidative balance, and resistance to WSSV. Shrimp were fed diets supplemented with 4% or 8% of each ingredient. The group receiving 8% buriti (B8) exhibited the most consistent improvements in immunoparameters, including enhanced phenoloxidase activity, elevated serum protein concentration, and stronger agglutination responses against marine bacterial pathogens. In contrast, pracaxi-supplemented diets negatively affected shrimp performance and survival. Following WSSV challenge, shrimp fed the B8 diet showed a 25% increase in survival compared to controls. Biochemical analyses revealed increased catalase activity, elevated reduced glutathione levels, and decreased lipid peroxidation, indicating enhanced antioxidant capacity and reduced oxidative stress in the hepatopancreas. Additionally, the expression of immune-related genes (PPAE1, PPAE2, TGII, CAT) and antiviral effectors (Vago4, Vago5, STING) was upregulated, suggesting activation of antimicrobial, redox-sensitive and interferon-like antiviral pathways. No significant changes in midgut bacterial microbiota were observed, the dietary safety of the B8 formulation. These findings demonstrate that dietary inclusion of buriti bran at 8% emerges as a natural feed additive that enhances WSSV resistance in *P. vannamei* by promoting immune resilience and oxidative homeostasis. Moreover, its sustainable production and alignment with circular economy principles and the Blue Amazon initiative underscore its potential as a functional feed additive for eco-friendly aquaculture.

**Keywords:** *Mauritia flexuosa*; *Pentaclethra macroloba*; dietary supplementation; intestinal immunity; immunoparameters; gene expression; antiviral defense.

## INTRODUCTION

The aquaculture industry has experienced substantial growth in response to the increasing global population. As a result, the cultivation of aquatic animals and plants has emerged as one of the most viable strategies to meet the growing demand for food [1]. To ensure its long-term effectiveness, this approach must align with the principles of sustainable production, technological innovation, environmentally responsible practices, and the development of balanced ecosystems - core pillars of the Blue Revolution [2].

Crustaceans play a crucial role in the global aquaculture sector [1] with the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) representing the most economically valuable species. Its global farming is driven by advantageous characteristics, including fast growth, efficient feed utilization, resilience to low salinity conditions, and strong market demand [3]. However, abrupt fluctuations in water quality and temperature, suboptimal nutrition, and inadequate management practices can lead to immune suppression and intestinal dysbiosis in shrimp, rendering them more susceptible to viral and bacterial diseases [4,5]. Consequently, disease outbreaks can result in significant economic losses and are typically caused by disruptions in the pathogen-host-environment interaction. White spot syndrome virus (WSSV) has historically been recognized as the most devastating viral pathogen impacting global shrimp aquaculture [5]. Its high virulence in penaeids is linked to its ability to replicate in various tissues, including hemocytes [6], leading to severe immune suppression and mortality outbreaks in farms. Conversely, WSSV replication in the shrimp midgut has been associated with dysbiosis, marked by pronounced shifts in the composition and abundance of intestinal bacterial communities [7]. Notably, intestinal dysbiosis in conjunction with viral infection may promote the establishment and proliferation of opportunistic pathogens in shrimp, as *Vibrio* spp. Among vibriosis, acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is the most severe and is attributed to virulent strains of *V. parahaemolyticus*, *V. punensis*, *V. harveyi*, *V. owensii*, and *V. campbellii* [8].

In response to numerous challenges, shrimp activate a range of cellular and humoral defense mechanisms primarily associated with the hemolymph. The intestinal mucosa may also contribute to their immune response [9]. The innate immune mechanisms triggered by shrimp include: (i) recognition of non-self-components by pattern recognition receptors/proteins (PRRs/PRPs); (ii) activation of intracellular

signaling pathways; (iii) phagocytosis, encapsulation, nodulation, and the formation of extracellular nucleic acid traps; (iv) production of microbicidal molecules such as antimicrobial peptides (AMPs), reactive oxygen species (ROS), and reactive nitrogen species (RNS); (v) melanization via the prophenoloxidase (proPO) activation system, generating cytotoxic intermediates; (vi) coagulation mediated by transglutaminase; (vii) agglutination through agglutinins/lectins; and (viii) antiviral defenses involving RNA interference (RNAi) and interferon-like, as well as apoptosis and autophagy [10–14].

Given that shrimp lack an adaptive immune system, conventional vaccination methods are ineffective against recurrent infections. Prophylactic strategies and the use of immunostimulatory substances can enhance their immunocompetence and maintain their overall health. A variety of substances/bioactive derived from plants, seaweeds, algae, fungi and microorganisms have been reported for their immunostimulatory properties in shrimp and can be administered via injection, immersion or dietary supplementation [15–17]. Among these delivery methods, dietary supplementation is particularly advantageous as it minimizes stress and allows animals to be treated simultaneously.

Recent research has underscored the significant benefits of phytobiotics in enhancing the health and performance of aquatic species [17]. Phytobiotics, derived from plant-based materials such as fruits, vegetables, herbs, and agricultural by-products (e.g., fruit waste), encompass a diverse array of bioactive compounds. The Amazonian biome boasts a rich plant biodiversity, the phytobiotic potential of which remains largely unexplored in the context of shrimp farming. *Mauritia flexuosa* (buriti) and *Pentaclethra macroloba* (pracaxi) are native Amazonian plant whose fruits are well documented for their nutraceutical and pharmacological properties in humans [18]. Buriti exhibits a complex phytochemical profile rich in bioactive constituents, including carotenoids, tocopherols, phenolic acids, dietary fiber, phytosterols, and both mono- and polyunsaturated fatty acids. These compounds have been associated with a broad spectrum of biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycemic, antimicrobial, photoprotective, antithrombotic, and antineoplastic effects, supporting its potential as a functional food ingredient and its applicability in the cosmetic industry [18]. Likewise, pracaxi oil is of particular interest to the cosmetic industry due to its high content of long-chain fatty acids, especially behenic acid, which possesses notable moisturizing and emollient properties. Furthermore, pracaxi oil contains phenolic compounds that contribute to its antioxidant capacity and antimicrobial activity [19].

Despite their promising bioactive properties, buriti and pracaxi have not yet been explored as dietary supplements to enhance shrimp immunocompetence and resistance to viral infections. To address this knowledge gap, we evaluated the potential immunoprotective effects of diets supplemented with by-products derived from buriti and pracaxi (bran from peels, seeds, and pulp), obtained following commercial oil extraction. Specifically, we investigated whether these enriched diets could enhance the immune response and antioxidant capacity of juvenile *P. vannamei*, resulting in higher survival rates when challenged with WSSV. This study provides valuable insights into the development of alternative feeding strategies aimed at improving shrimp health, reducing disease incidence, and promoting a circular economy through the sustainable use of plant-based by-products in aquaculture nutrition.

## MATERIAL AND METHODS

### 1.1.3 Experimental feed design and composition

The experimental diets were formulated and produced by Alcon® Ltda (Dehydrated Food Industry and Commerce), using Alcon® Shrimp Nano Stick as the basal feed. The supplemental plant-based ingredients consisted of bran derived from *Mauritia flexuosa* (buriti) and *Pentaclethra macroloba* (pracaxi), supplied by Prospera Nutri®. All diets were formulated to be both isocaloric and isoproteic, ensuring nutritional consistency across all treatments. The fruit bran used in the formulations is a dehydrated by-product obtained through cold-press oil extraction, which mechanically processes the peel, pulp, and seeds. Typically generated as a residue by the cosmetics industry, this material is repurposed in the present study as a sustainable ingredient for aquafeeds. The formulation and centesimal composition of the diets (**Table 1**) followed the minimum nutritional requirements recommended for *Penaeus vannamei* reared in recirculating aquaculture systems (RAS), in accordance with the guidelines provided by the International Aquaculture Feed Formulation Database (IAFFD) [20].

**Table 1.** Composition of the control and supplemented diets.

| Ingredients                   | Ingredients (%)          |                    |           |           |           |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
|                               | Control diet<br><b>C</b> | Supplemented diets |           |           |           |
|                               |                          | <b>B4</b>          | <b>P4</b> | <b>B8</b> | <b>P8</b> |
| Soybean bran                  | 32.03                    | 30.75              | 30.75     | 29.47     | 29.47     |
| Corn bran                     | 30.69                    | 29.46              | 29.46     | 28.23     | 28.23     |
| Dehydrated spirulina *        | 12                       | 11.52              | 11.52     | 11.04     | 11.04     |
| Fish meal                     | 10                       | 9.60               | 9.60      | 9.20      | 9.20      |
| Squid meal                    | 5                        | 4.80               | 4.80      | 4.60      | 4.60      |
| Yeasts                        | 3.65                     | 3.50               | 3.50      | 3.36      | 3.36      |
| Refined soybean oil           | 2.18                     | 2.09               | 2.09      | 2.01      | 2.01      |
| Cassava starch                | 1.07                     | 1.03               | 1.03      | 0.98      | 0.98      |
| Vitamin-mineral premix        | 0.85                     | 0.82               | 0.82      | 0.78      | 0.78      |
| Mineral premix                | 0.80                     | 0.77               | 0.77      | 0.74      | 0.74      |
| Sodium chloride               | 0.60                     | 0.58               | 0.58      | 0.55      | 0.55      |
| Fish oil                      | 0.59                     | 0.57               | 0.57      | 0.54      | 0.54      |
| Enzyme additive               | 0.35                     | 0.34               | 0.34      | 0.32      | 0.32      |
| Prebiotic additive            | 0.11                     | 0.11               | 0.11      | 0.10      | 0.10      |
| Antioxidants**                | 0.05                     | 0.05               | 0.05      | 0.05      | 0.05      |
| Yucca extract                 | 0.03                     | 0.03               | 0.03      | 0.03      | 0.03      |
| Buriti bran                   | 0                        | 4                  | 0         | 8         | 0         |
| Pracaxi bran                  | 0                        | 0                  | 4         | 0         | 8         |
| <b>Diet composition</b>       |                          |                    |           |           |           |
| Basal diet                    | 100                      | 96                 | 96        | 92        | 92        |
| Buriti bran                   | 0                        | 4                  | 0         | 8         | 0         |
| Pracaxi bran                  | 0                        | 0                  | 4         | 0         | 8         |
| <b>Centesimal composition</b> |                          |                    |           |           |           |
| Dry matter                    | 92.34                    | 92.05              | 92.08     | 92.11     | 92.16     |
| Crude protein                 | 35.11                    | 34.09              | 34.84     | 32.99     | 34.47     |
| Ether extract                 | 5.61                     | 5.69               | 6.43      | 5.77      | 7.26      |
| Crude fiber                   | 2.42                     | 4.53               | 3.31      | 6.64      | 4.20      |
| Ash (mineral matter)          | 7.92                     | 7.82               | 7.79      | 7.71      | 7.63      |
| Calcium                       | 1.08                     | 1.04               | 1.04      | 1.00      | 1.00      |
| Phosphorus                    | 0.74                     | 0.71               | 0.71      | 0.68      | 0.68      |
| Metabolizable energy***       | 3,513                    | 3,472              | 3,561     | 3,399     | 3,576     |

C: Alcon® Shrimp Nano Sticks (basal diet; control); experimental diets were supplemented with 4% (B4) or 8% (B8) buriti bran, and 4% (P4) or 8% (P8) pracaxi bran.

\* *Arthrospira platensis*

\*\*citric acid, BHA, BHT

\*\*\*kcal/kg

### 1.1.4 Animals and experimental design

Juvenile *P. vannamei* shrimp ( $12 \pm 2.4$  g), of both sexes, apparently healthy and in the intermolt stage, were supplied by the Marine Shrimp Laboratory (LCM, UFSC) and transported to the aquarium facilities of the Laboratory of Applied Immunology to Aquaculture (LIAA, UFSC). Shrimp were randomly distributed into tanks (10 animals per tank), containing 25 L of seawater (salinity: 35 g/L) maintained in a closed recirculation system under constant aeration (dissolved oxygen  $> 5$  mg/L) and temperature ( $29 \pm 1$  °C). Total ammonia nitrogen (TAN in mg/L), nitrite (N-NO<sub>2</sub> in mg/L), alkalinity (CaCO<sub>3</sub> in mg/L), salinity (g/L), and pH were constantly monitored. Shrimp were fed twice daily (8 am and 5 pm) at a rate of 3-4% of their live biomass.

Two sequential experiments were conducted. The aim of the first experiment (Experiment 1) was to evaluate and identify the most effective supplemented diet (either 4% or 8% inclusion of pracaxi or buriti bran) for improving the overall health status of shrimp, as determined through hemato-immunological analyses. In Experiment 1, shrimp ( $n = 150$ ) were randomly allocated in triplicate into five experimental groups according to the diet received (10 shrimp/replicate/treatment; 30 shrimp/group): **C** (control diet: Alcon® Shrimp Nano Sticks); **B4** (diet supplemented with 4% buriti bran); **B8** (diet supplemented with 8% buriti bran); **P4** (diet supplemented with 4% pracaxi bran); and **P8** (diet supplemented with 8% pracaxi bran). These concentrations were chosen based on a similar previous study using buriti pulp [21]. On the 30<sup>th</sup> day of dietary supplementation, hemolymph was collected and hemato-immunological parameters analyzed. Based on the results from Experiment 1, the B8 diet was selected for use in the subsequent trial (Experiment 2). Details of the experimental design are illustrated in **Fig. 1**.

In Experiment 2, the potential immunoprotective effects of dietary supplementation with the B8 diet in shrimp challenged with WSSV was evaluated. This evaluation was based on survival rates, hemato-immunological parameters, and the antioxidant capacity of the hepatopancreas. Additionally, molecular analyses were conducted on midgut samples to assess the expression of immune-related genes and quantify bacterial communities (**Fig. 1**). A total of 120 shrimp were randomly assigned to two groups, each consisting of six replicates (10 animals per replicate, 60 animals per group), and fed for 50 days with either the control diet (C) or the supplemented diet (B8). On the 20<sup>th</sup> day, half of the shrimp from each group were euthanized for tissue

collection and subsequent biochemical and molecular analyses. This initial supplementation period, referred to as the pre-challenge phase, was designed to evaluate the general health status of shrimp fed the B8 diet. On the 30<sup>th</sup> day of dietary supplementation, 15 shrimp from each group were challenged with WSSV, and supplementation was maintained until the end of the experiment (day 50). The viral challenge was performed by intramuscular injection of 50  $\mu$ L into the first dorsal segment containing  $3 \times 10^3$  WSSV copies, corresponding to the 15-day median lethal dose (LD<sub>50/15</sub>) as described by [22]. Control shrimp were mock-injected with Tris-NaCl buffer (20 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7.4). Mortality was recorded daily, and cumulative survival curves were generated using the Kaplan-Meier plot.

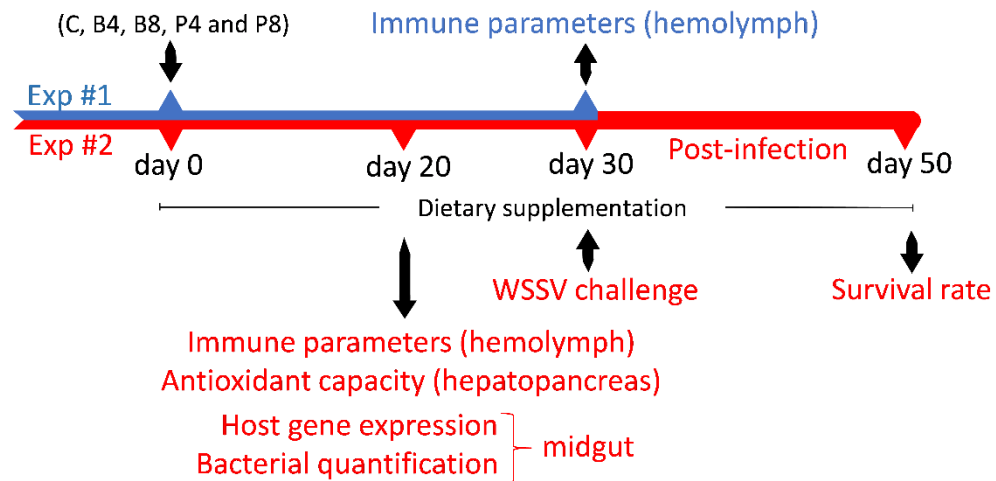


**Figure 1.** Experimental design. Experiment 1: Selection of optimal dietary ingredient concentration: After a seven-day acclimation period, juvenile *P. vannamei* were fed for 30 days with either a control diet (C; Alcon® Shrimp Nano Sticks) or diets supplemented with buriti (B) or pracaxi (P) brans at 4% (B4, P4) or 8% (B8, P8). Hemolymph was collected for analysis of immunological parameters. Experiment 2: Evaluation of the immunoprotective effect of buriti supplementation: Dietary supplementation with either the control (C) or the buriti-supplemented diet (B8) was initiated on day 0 and continued for 20 days. On the 20<sup>th</sup> day, tissues were collected for hemato-immunological assessments, evaluation of hepatopancreas antioxidant capacity, and midgut molecular analyses (immune-related gene expression and bacterial quantification). On the 30<sup>th</sup> day, shrimp were challenged with WSSV (LD<sub>50/15</sub>), and survival was monitored until day 50.

### 1.1.5 Tissues collection

Hemolymph was withdrawn into MAS (modified Alsever solution: 336 mM NaCl, 115 mM glucose, 27 mM sodium citrate, 9 mM EDTA, pH 7.2) from the shrimp ventral sinus (three pools of five animals per condition) by using a 1-mL ice-cold syringe. After hemolymph collection, shrimp from Experiment 2 were euthanized by hypothermal shock (ice bath for 15 min) for midgut (MG) and hepatopancreas (HP) sampling, as described by [23]. The MG was dissected, with three pooled samples

prepared per condition (each pool consisting of three animals). Following removal of luminal contents, tissues were rinsed with wash buffer (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7.4) and preserved in RNAlater™ (Invitrogen) at a ratio of 0.5 g tissue to 2.5 mL solution (w/v), and stored at -20 °C. These samples were later used for the extraction of total RNA (for relative gene expression analysis) and genomic DNA (for absolute bacterial quantification), as described in Sections 2.7 and 2.8. HP samples from five animals per group were collected, washed with Tris-saline buffer, and stored at -80 °C for later antioxidant and lipid peroxidation analyses.

### 1.1.6 Hemato-immunological parameter assays

The following cellular and humoral immune parameters were assessed: total hemocyte count (THC), total protein concentration (PC), phenoloxidase activity (POA), and hemolymph agglutination capacity (AGT), as described by [24]. Hemocytes were fixed in 4% formaldehyde, and THC was determined using a Neubauer hemocytometer. For evaluation of humoral parameters, hemolymph was collected without anticoagulant (3 pools of five animals per condition), allowed to clot at 4 °C for 8 h, and then centrifuged repeatedly at 2,000 ×g for 10 min at 4 °C to obtain serum.

POA was measured in serum samples diluted 15 × in Tris-buffered saline (TBS-PO: 50 mM Tris, 330 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4), incubated with 1 mg/mL trypsin (Sigma) for 5 min, followed by addition of an equal volume of 3 mg/mL L-DOPA. After a further 5-minute incubation, POA was quantified spectrophotometrically by measuring dopachrome formation at 490 nm. Basal POA was determined under identical conditions, with trypsin replaced by ultrapure water. Enzymatic activity was expressed as units (U), with one unit defined as an increase of 0.001 in absorbance per minute per milligram of protein at 20 °C [25]. The PC was determined using the bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce BCA Protein Assay™ Kit, Thermo Fisher Scientific) in the diluted (1,000 ×). Bovine Serum Albumin served as a standard. POA measurements were conducted in quintuplicate, while PC assays were performed in triplicate.

The hemolymph agglutination capacity was assessed using dog erythrocytes and seven marine bacterial strains, following the method described by [24]. The bacterial panel included Gram-positives *Microbacterium maritopicum* CIP 105733, *Lactobacillus plantarum* CQPBA 007 07 DRM01, and *Corynebacterium* (=

*Brevibacterium) stationis* CIP 101282, and Gram-negative *Vibrio harveyi* ATCC 14126, *V. nigripulchritudo* CIP 103195, *V. parahaemolyticus* IOC 18950, and *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966. Before conducting the assays, bacteria were inactivated by heating at 70°C for 40 min. The absence of bacterial growth was confirmed on saline LB agar plates (10 g/L bactopectone, 5 g/L yeast extract, 30 g/L NaCl, 15 g/L agar, pH 7.2) during 18 h at 30° for *M. maritpicum* or 48h at 20°C for *Vibrio* spp.; on MRS (De Man-Rogosa-Sharpe) during 48 h at 35°C for *L. plantarum* and on LB agar plates during 24 h at 30° C for both, *A. hydrophila* and *C. sationis*.

In the agglutination assays (performed in triplicates), 50 µL of serum samples, serially diluted in TBS-AGT (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4), was incubated with an equal volume of a 2 % suspension of dog erythrocytes (diluted in buffer) or bacterial suspensions ( $4.4 \times 10^7$  to  $4.8 \times 10^8$  CFU/well of *Vibrio* spp.;  $1.5 \times 10^8$  CFU/well of *M. maritpicum* and *L. plantarum*;  $9 \times 10^{10}$  CFU/well of *A. hydrophila* and  $7 \times 10^9$  CFU/well of *C. stationis*) in U-shaped bottom 96-well microplates for 1.5 h (erythrocytes) or 24 h (bacteria) at 20 °C. Negative controls consisted in replacing shrimp serum by TBS. The AGT was expressed in Log<sub>2</sub>, as the reciprocal of the highest serum dilution exhibiting a positive reaction compared to the negative control. Data from Experiment 1 were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test for THC, PC, and POA, and the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test for AGT. Data from Experiment 2 were analyzed using an unpaired two-tailed Student's t-test for THC, PC, and POA, and the Mann-Whitney U test for AGT. Statistical significance was set at  $p \leq 0.05$ .

### 1.1.7 Antioxidant capacity and lipid damage in the hepatopancreas

Biochemical parameters were assessed exclusively in the hepatopancreas of shrimp from Experiment 2. The analyses included the enzymatic activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione-S-transferase (GST), as well as the levels of reduced glutathione (GSH), protein sulfhydryl groups (P-SH), and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). Hepatopancreas samples were homogenized in lysis buffer (0.5 M sucrose, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-Base, 0.15 M KCl, 1 mM DTT, and 0.05 mM PMSF, pH 7.6), centrifuged (10,000 ×g for 20 min at 4 °C), and supernatant maintained at -20 °C until analyses. For samples intended for GSH evaluation, homogenization was performed without the addition of DTT.

PC was determined using the Biuret method (Bioclin®). CAT activity was based on the decomposition of 50 mM hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), with quantification at 240 nm [26]. Results were expressed as CAT units, corresponding to the hydrolysis of 1  $\mu\text{mol}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  per minute per mg of protein at 25 °C, pH 8.0. SOD activity was assessed by measuring the reduction of cytochrome C, following the method described by [27]. Results are expressed in SOD units, where one unit corresponds to the amount of enzyme required to inhibit 50 % of cytochrome C reduction per minute per mg of protein at 25 °C, pH 7.8. GST activity was determined by the conjugation of GSH (1 mM) with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (1 mM CDNB), with the formation of the GSH-CDNB complex monitored by absorbance ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ; ELx800 microplate reader, BioTek™), according to [28], and expressed in nmol of CDNB conjugated per minute per mg of protein.

GSH and P-SH levels were measured from samples (2 mg/mL) precipitated with 50% trichloroacetic acid (TCA), followed by centrifugation at 20,000  $\times g$  for 10 min at 4 °C. The supernatant was used to measure GSH levels, and the pellet was used to quantify P-SH, according to the method described by [29]. Lipid peroxidation in the hepatopancreas was evaluated by measuring TBARS, following the method described by [30]. The chromogen formed was quantified by fluorimetry (Victor 2, Perkin Elmer™) at excitation and emission wavelengths of 515 and 550 nm, respectively. Tetramethoxypropane (TMP, Sigma-Aldrich™) was used as the standard. Data related to antioxidant analyses and lipid damage were analyzed using the Student's t-test.

### **1.1.8 Nucleic acid extraction and cDNA synthesis**

Total RNA and genomic DNA (gDNA) from the MGs were extracted using the AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN™), following the manufacturer's instructions. Quantification and quality of the extracted RNA and gDNA were assessed by spectrophotometry and 0.8% agarose gel electrophoresis, respectively. Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed following heat denaturation (70 °C for 5 min), using 2.5  $\mu\text{g}$  of total RNA in a 20  $\mu\text{L}$  reaction volume with the SuperScript IV® Reverse Transcriptase kit (Invitrogen™), 0.5 mM dNTP mix (Sinapse), 20 U/ $\mu\text{L}$  RiboLock™ RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific™), and 2.5  $\mu\text{M}$  oligo(dT)<sub>12-18</sub> primers (Bioline). cDNA was used for host gene expression analysis (Section 2.7), while gDNA was used for bacterial quantification (Section 2.8).

### 1.1.9 Fluorescence-based reverse transcription real-time quantitative PCR

RT-qPCR amplifications were performed in the StepOnePlus Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) in a final volume of 15  $\mu$ L containing 2  $\mu$ L of cDNA (diluted 1:50), 0.2  $\mu$ M of each primer (**Table S1**), and 7.5  $\mu$ L of PowerUp SYBR Green Master Mix 2 $\times$  (Thermo Fisher Scientific). RT-qPCR assays were submitted to an initial denaturation step at 95  $^{\circ}$ C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95  $^{\circ}$ C for 15 s and annealing/extension at 60  $^{\circ}$ C for 1 min. The average C<sub>q</sub> values of four reference genes (EF1 $\alpha$ , Actin, RpS6, and RpS3A) were used for RT-qPCR data normalization, and the relative expression of the target genes was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  method [31]. The relative expression levels of the 42 target genes (from the B8 group) were calibrated with the MG expression profile of shrimp fed the basal diet (control group). All assays were performed in duplicate. Differences in gene expression were considered statistically significant at  $p < 0.05$  (cutoff of 2-fold change in expression levels) using an unpaired Student's t-test. The heatmap was generated using ClustVis software (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) [32].

### 1.1.10 Absolute bacteria quantification in the midgut

Assays for the absolute quantification of some major bacterial groups commonly found in the MG of *P. vannamei* were performed using quantitative PCR (qPCR) by using specific primers to conserved regions of the 16S rRNA gene. Targeted groups included Gammaproteobacteria classe, Firmicutes, Actinobacteria, and Bacteroidetes phyla, as well as the genus *Vibrio* spp. [33,34]. The choice of bacterial groups was guided by prior reports indicating their increased prevalence in the intestine of penaeid shrimp [35]. The qPCR amplifications were performed in triplicate using a final volume of 15  $\mu$ L contained 1  $\mu$ L of genomic DNA (100 ng/ $\mu$ L), 0.2  $\mu$ M of each primer, and 7.5  $\mu$ L of PowerUp SYBR Green Master Mix 2 $\times$  (Thermo Fisher Scientific), under the amplification conditions previously described. Bacterial counts in shrimp MGs were calculated using a standard curve derived from a 10-fold dilution series of a plasmid containing the DNA target sequence ( $10^8$  to  $10^2$  plasmids/ $\mu$ L;  $R^2 = 0.999$ ). Differences in the absolute quantification of bacteria were considered statistically significant at  $p < 0.05$  using Unpaired Student's t-test.

## RESULTS

### 1.1.11 The water quality parameters remained stable

In Experiment 1, minor fluctuations in water quality were observed, including a transient increase in total ammonia levels on day 8 (0.051 mg/L unionized ammonia) and a temporary drop in total alkalinity on day 17 (70 mg CaCO<sub>3</sub>/L) (data not shown). However, these deviations were promptly corrected and remained within the tolerable range for *P. vannamei* [36]. Mortality was recorded in several experimental groups (**C**: 17%, **B4**: 17%, **P4**: 7%), but not in the **B8** group. Notably, the highest mortality rate was observed in shrimp fed the pracaxi-supplemented diet (**P8**: 30%). In Experiment 2, where the selected diet (B8) was used, water quality was monitored throughout the 50-day trial. No mortality was observed and the water quality parameters remained within the optimal range to ensure the health and welfare of the shrimp [38] (**Table 2**).

**Table 2.** Physico-chemical water parameters in tanks containing shrimp during Experiment 2 (mean  $\pm$  SD). Shrimp were fed either a basal diet (C) or a diet supplemented with 8% buriti bran (B8).

| Water quality variable                | Diets          |                |
|---------------------------------------|----------------|----------------|
|                                       | C              | B8             |
| Total ammonia N-N <sub>3</sub> (mg/L) | 0.02 $\pm$ 0.1 | 0.02 $\pm$ 0.1 |
| Nitrite N-NO <sub>2</sub> (mg/L)      | 0.8 $\pm$ 0.2  | 0.7 $\pm$ 0.3  |
| Alkalinity (mg CaCO <sub>3</sub> /L)  | 171 $\pm$ 18   | 171 $\pm$ 18   |
| Salinity (g/L)                        | 35 $\pm$ 0.2   | 35 $\pm$ 0.2   |
| Temperature (°C)                      | 28 $\pm$ 0.3   | 28 $\pm$ 0.2   |
| Dissolved oxygen (mg/L)               | 6 $\pm$ 0.5    | 6 $\pm$ 0.3    |
| pH                                    | 8 $\pm$ 0.2    | 8 $\pm$ 0.2    |

### 1.1.12 B8 diet improved same hemato-immunological responses in shrimp

The dietary supplementation of *P. vannamei* juveniles with an 8% buriti bran diet (B8) resulted in significant improvements in several hemato-immunological indices compared to the control group (**Table 3**). However, the B4 diet also yielded favorable outcomes, particularly in total THC and the agglutination titer against potentially pathogenic Vibrionaceae species (*V. nigripulchritudo* and *V. harveyi*). In contrast, animals in the B8 group exhibited a twofold increase in the activity of PO, the enzyme responsible for melanization, and a greater ability to recognize and agglutinate both Gram-positive (*M. maritropicum*) and Gram-negative bacteria (*V. harveyi* and *A. hydrophila*). Supplementation with B8 was also associated with enhanced agglutination of canine erythrocytes. Interestingly, shrimp receiving pracaxi bran diets

(P4 and P8) showed lower AGT of the Gram-positive *C. stationis* compared to the control group. Furthermore, *V. harveyi* was more effectively recognized and agglutinated by the serum of all animals receiving supplemented diets (B4, B8, P4, and P8) compared to those receiving the control diet. Based on these findings, the B8 diet was selected for Experiment 2, where its effect immunoprotective potential against WSSV challenges was evaluated.

Table 3. Hemato-immunological parameters in experiment 1. Shrimp were fed for 30 days with a control diet (C: Alcon® Shrimp Nano Sticks) or diets supplemented with buriti (B4, B8) or pracaxi (P4, P8) bran at 4% or 8% (mean  $\pm$  SD).

| Immunoparameters               |                            | C          | B4                 | B8                   | P4                | P8                 |
|--------------------------------|----------------------------|------------|--------------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| THC (10 <sup>6</sup> cells/mL) |                            | 29.0 ± 4.4 | <b>41.2 ± 4.1*</b> | 34.03 ± 4.6          | 24.8 ± 7.2        | 25.9 ± 5.1         |
| PC (mg/mL)                     |                            | 116 ± 16.5 | 102.1 ± 12.8       | 127.2 ± 22.3         | 102.3 ± 17.3      | 81.8 ± 13.3        |
| POA (U/min/mg)                 |                            | 86.8 ± 24  | 146.5 ± 24.3       | <b>174.9 ± 53.2*</b> | 144.9 ± 17.8      | 97.7 ± 12.2        |
| AGT (Log <sub>2</sub> )        | Dog erythrocytes           | 14.2 ± 0.5 | 14.6 ± 0.0         | <b>15.6 ± 0.0*</b>   | 13.9 ± 0.6        | 14.6 ± 0.0         |
|                                | <i>M. maritypicum</i>      | 9.2 ± 0.6  | <b>12.2 ± 0.6*</b> | <b>13.2 ± 0.6*</b>   | 10.2 ± 0.6        | <b>11.6 ± 0.0*</b> |
|                                | <i>C. stationis</i>        | 11.2 ± 0.6 | 10.5 ± 0.0         | 12.9 ± 0.6           | <b>7.9 ± 0.6*</b> | <b>7.9 ± 0.6*</b>  |
|                                | <i>V. harveyi</i>          | 6.9 ± 0.6  | <b>9.2 ± 0.6*</b>  | <b>8.2 ± 0.6*</b>    | <b>9.9 ± 0.6*</b> | <b>9.2 ± 0.6*</b>  |
|                                | <i>V. nigripulchritudo</i> | 9.6 ± 0.6  | <b>12.6 ± 0.0*</b> | 9.9 ± 0.6            | 8.9 ± 0.6         | 10.58 ± 0.0        |
|                                | <i>A. hydrophila</i>       | 12.6 ± 1.0 | 10.9 ± 1.2         | <b>13.6 ± 0.0*</b>   | 9.9 ± 0.6         | 11.92 ± 0.6        |

\*Asterisk indicate statistical differences from the control group ( $p < 0.05$ ). THC = total hemocyte counts; PC = total protein concentration; POA= phenoloxidase activity; AGT = agglutination titer.

### 1.1.13 B8 diet enhances immunostimulatory response

Twenty days of dietary supplementation with the B8 diet resulted in a significant increase in PC (B8 = 161.1  $\pm$  16.7 mg/mL; C = 119.0  $\pm$  20.3 mg/mL), without affecting THC (C = 35.2  $\pm$  7.2  $\times 10^6$  cells/mL; B8 = 33  $\pm$  4.8  $\times 10^6$  cells/mL) or PO activity (C = 32.9  $\pm$  15.9 U/min/mg; B8 = 52.1  $\pm$  18.4 U/min/mg) (**Fig. 2A**). Notably, shrimp fed the B8 diet for 50 days exhibited greater resistance to WSSV-induced mortality, with a survival rate 25% higher than that of the control group (B8 = 58%; C = 33%) (**Fig. 2B**). In addition to its protective effect on shrimp survival following systemic challenge with WSSV, B8 supplementation was associated with an enhanced capacity for shrimp to recognize and agglutinate a variety of marine bacteria *in vitro* (**Fig. 2A**). The shrimp pathogenic Vibrionaceae species *V. harveyi* and *V. nigripulchritudo*, as well as the fish pathogenic Gram-negative *A. hydrophila*, were particularly recognized and agglutinated, exhibiting significantly higher agglutination titers (3,072 $\times$ ; 24,576 $\times$ ; 49,152 $\times$ , respectively), up to four times greater than those of the control shrimp

(1,536×; 6,144×; 12,288×, respectively). Similarly, the Gram-positive bacterium *C. stationis* was agglutinated up to 4.7 times higher titer by the serum of shrimp fed the B8 diet (1,536 to 6,144× dilution; control shrimp 384 to 768×). No significant differences in agglutination were observed for *M. maritropicum* and *V. parahaemolyticus* between control and supplemented animals. By contrast the intestinal commensal *L. plantarum* was not agglutinated by the hemolymph of *P. vannamei*.

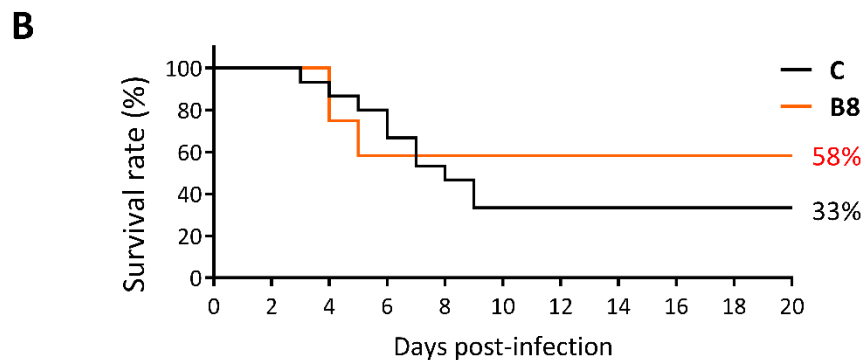
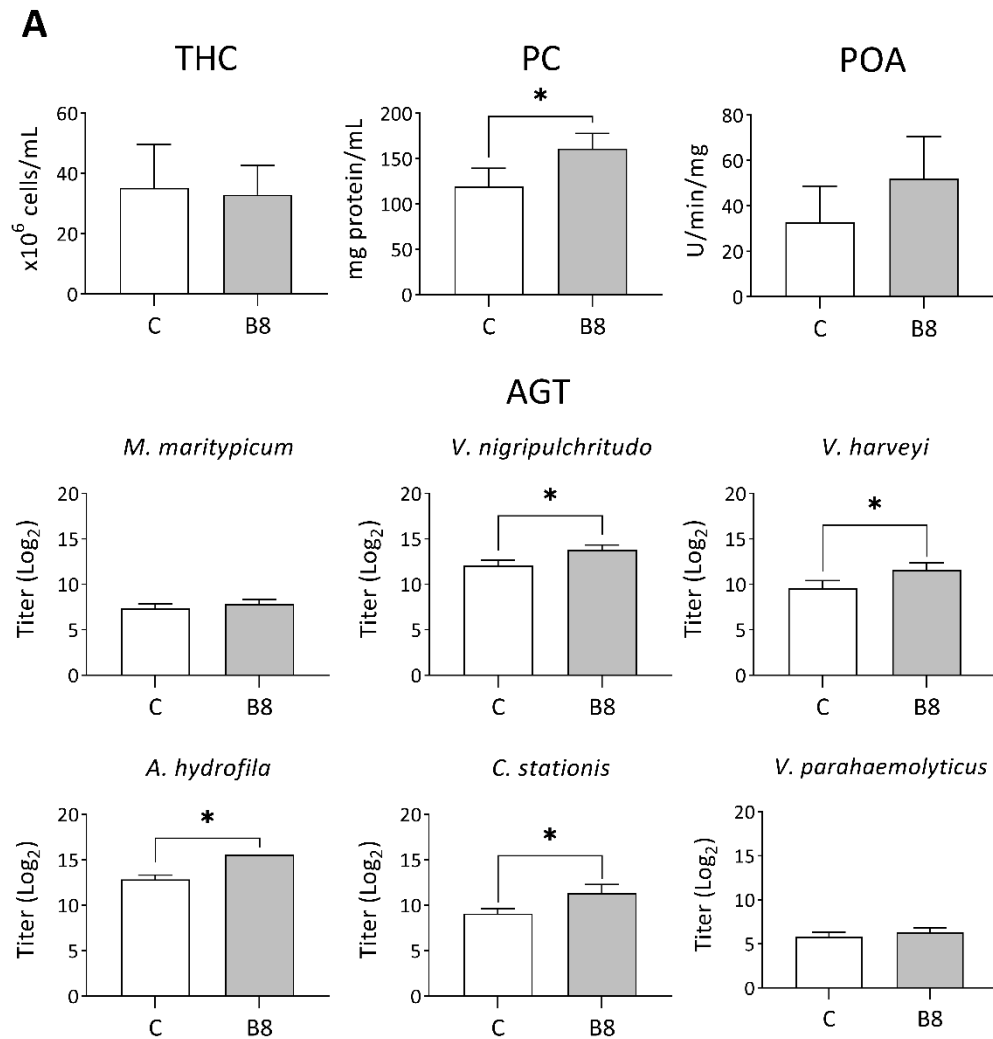


**Figure 2.** (A) Shrimp hemato-immunological profile in experiment 2. Shrimp were fed with a control (C) or 8% buriti bran supplemented diet (B8) for 20 days. Immune parameters evaluated during the pre-challenge phase included total hemocyte count (THC), total serum protein concentration (PC), phenoloxidase activity (POA), and the agglutination capacity of hemolymph against marine Gram-positive bacteria *Microbacterium maritropicum* and *Corynebacterium stationis*, as well as Gram-negative bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi*, *V. nigripulchritudo*, and *V. parahaemolyticus*. Values are presented as mean  $\pm$  SD (\* $p < 0.05$ ). (B) Kaplan–Meier survival plot of shrimp exposed to WSSV. On the 30<sup>th</sup> day of dietary supplementation, 15 shrimp from each group were challenged  $3 \times 10^3$  WSSV copies, and supplementation was maintained until the end of the experiment (day 50).

### 1.1.14 B8 Diet Enhances Antioxidant Defense and Reduces Lipid Peroxidation in Hepatopancreas

The dietary supplementation with B8 was associated with a significant increase in the levels of two antioxidant molecules in the shrimp hepatopancreas: GSH (1.5 $\times$  higher) and CAT (2 $\times$  higher) (**Fig. 3**). Additionally, these animals exhibited 34% lower levels of the lipid peroxidation indicator TBARS compared to those receiving the control diet. On the other hand, the antioxidant activity of GST and SOD, as well as the levels of P-SH were not altered by the B8 dietary supplementation.

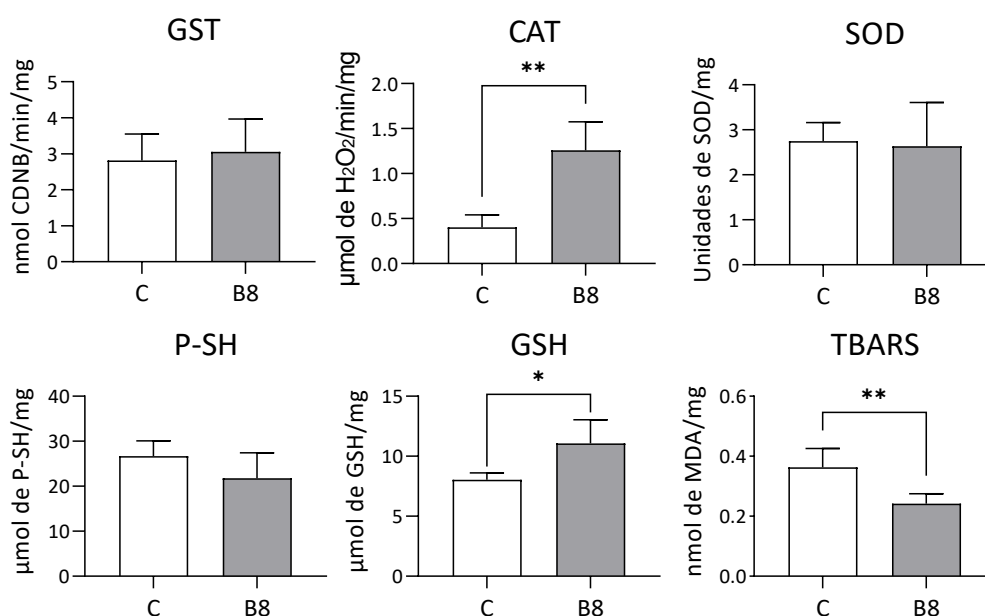


**Figure 3.** Antioxidant capacity and lipid damage parameters in the hepatopancreas. Shrimp fed a basal diet (C; control) or diet supplemented with 8% buriti bran (B8) during 20 days. The analyses included levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total sulfhydryl groups (P-SH), and the enzymatic activity of glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and reduced glutathione (GSH). Values are presented as mean  $\pm$  standard deviation. Significant differences between treatments (\* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

### 1.1.15 Dietary buriti bran enhances the expression of antiviral and immune effector genes in the shrimp midgut

Given the limited current knowledge regarding intestinal immunity in penaeid shrimp and gene modulation associated with dietary supplementation, the expression of 42 genes in the MG of *P. vannamei* was evaluated. These genes belong to eight functional categories related to the immune system. Although all genes were constitutively expressed in the shrimp, transcript levels varied depending on the diet administered. A global analysis of gene expression (**Fig. 4A**) revealed that feeding with diets supplemented with 8% buriti bran positively modulated the expression of several genes, particularly those related to functional categories of antioxidant/redox activity, cytokines, antiviral responses, antimicrobial defenses, pattern recognition proteins, and homeostasis. However, statistically significant differences were observed only in eight genes. Transcripts of genes encoding the prophenoloxidase-activating enzymes, PPAE1 (2-fold change) and PPAE2 (3-fold change), were significantly upregulated in the MG of shrimp fed the B8 diet compared to the control diet group (**Fig. 4B**). Similarly, the B8 group exhibited elevated transcriptional levels of cytokines involved in nonspecific antiviral defense, including Vago4 (4.3-fold change), Vago5 (3.5-fold change), and STING (2-fold change). Additionally, increased expression was observed for TGII (4-fold change) and CAT (3.5-fold change), enzymes involved in coagulation and antioxidant defense, respectively. Conversely, only the expression of the gene encoding the oxidative enzyme dual oxidase 1 (DUOX1) was significantly higher in shrimp fed the control diet (3-fold change) (**Fig. 4B**).

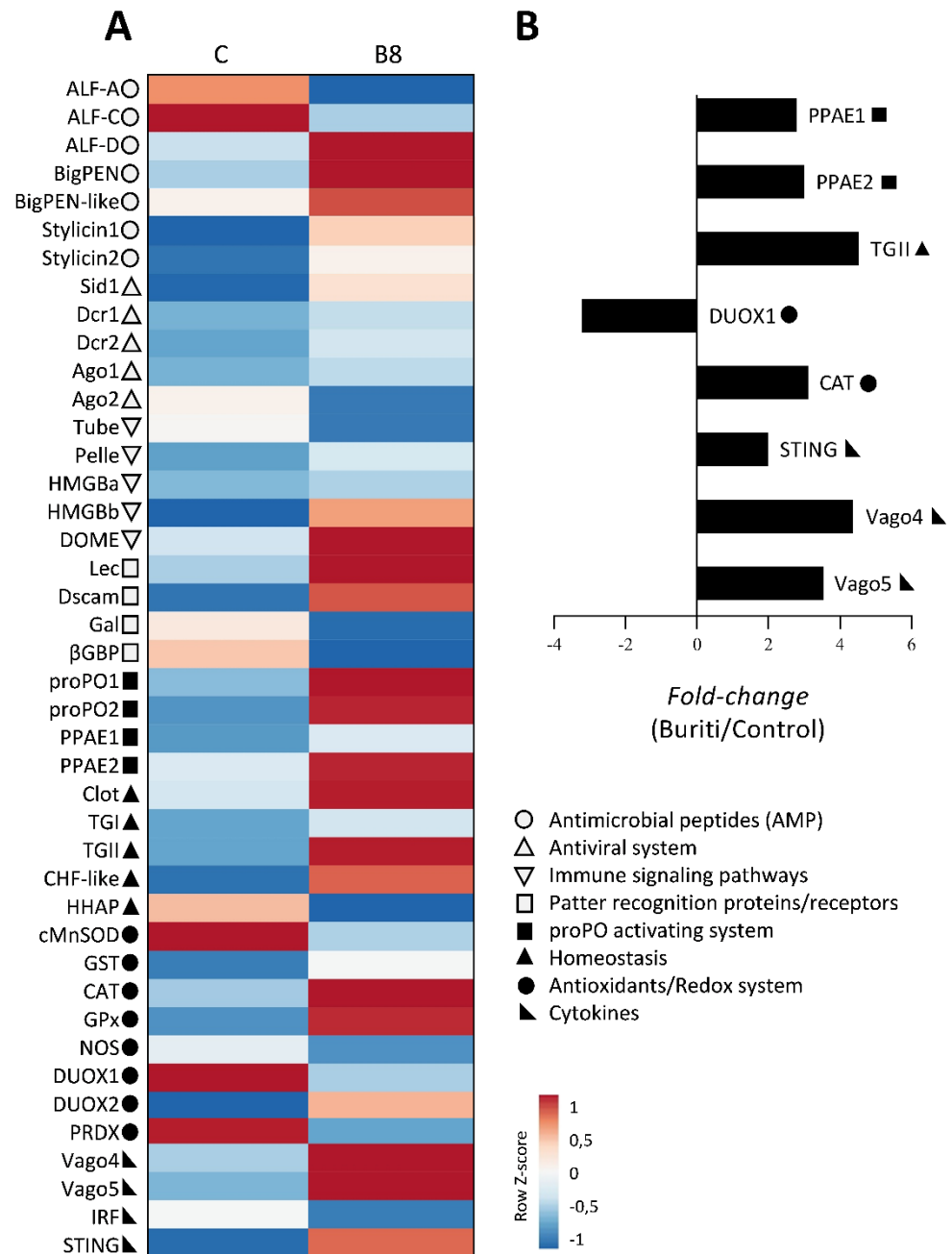


**Figure 4.** Heatmap showing the expression profiles of 42 immune-related genes in the midgut of *P. vannamei* fed for 20 days with either a non-supplemented control diet (C) or a diet supplemented with 8% buriti bran (B8). Each cell represents the mean expression level of a specific gene based on three pooled samples per treatment. Color intensity (ranging from blue to red) reflects the magnitude of gene expression, as indicated by the color scale at the bottom right of the heatmap. (B) Differential expression of genes showing statistically significant transcriptional changes ( $\geq 2$ -fold change; unpaired Student's t-test,  $p \leq 0.05$ ) between the B8 and control (C) groups. Relative expression levels (B8/C) were calibrated to gene expression in the MG of shrimp fed the control diet. Functional gene categories are indicated by symbols next to each gene name.

#### 1.1.16 Buriti bran supplementation preserves intestinal bacterial composition

Dietary supplementation with B8 did not result in significant changes in the absolute abundance of 16S rRNA gene copies or in the composition of the evaluated bacterial groups (**Fig. 5A**). In terms of relative abundance, the class Gammaproteobacteria was the most predominant in both groups (Control: 43.5%; B8: 39.9%), followed by the phyla Bacteroidetes (C: 34%; B8: 30.4%), Actinobacteria (C: 17.7%; B8: 17.5%), and Firmicutes (C: 5.8%; B8: 12.3%) (**Fig. 5B**).

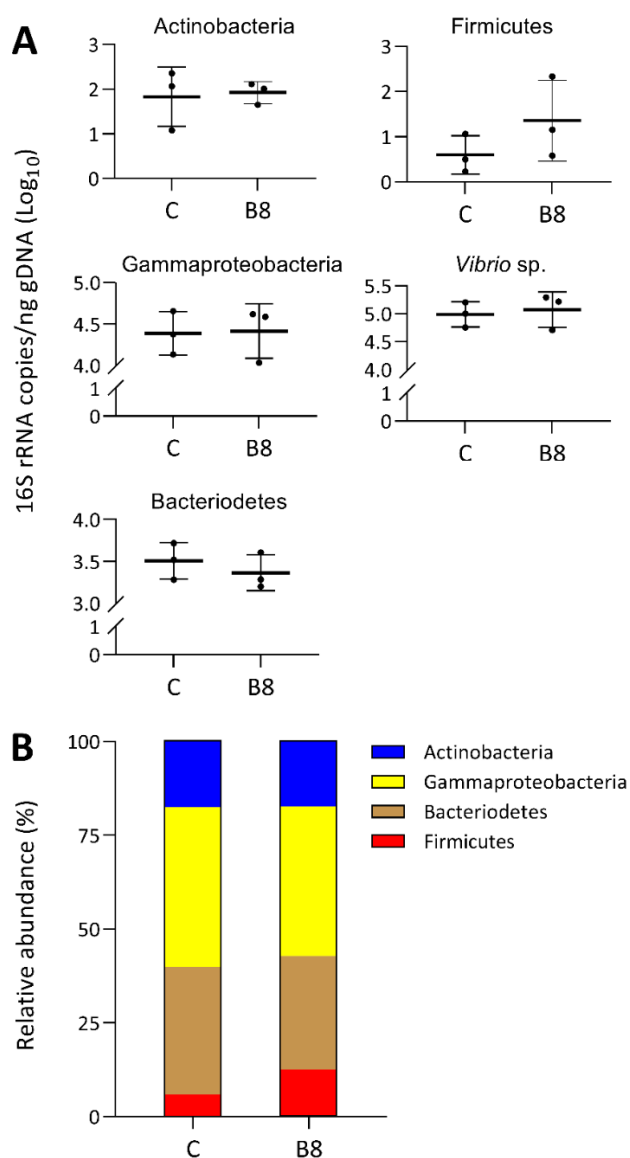


**Figure 5.** (A) Absolute quantification of some bacterial groups in the MG of *P. vannamei* after 20 days of feeding with either a non-supplemented diet (C) or a diet supplemented with 8% buriti bran (B8). Values are expressed on a  $\text{Log}_{10}$  scale as 16S rRNA gene copies per ng of gDNA. Results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. (B) Relative abundance of the phyla Actinobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes, and the class Gammaproteobacteria in the shrimp MG. Percentages represent the proportion of 16S rRNA gene copies per ng of gDNA for each group.

## DISCUSSION

Our results showed that supplementation with 8% buriti bran (B8) enhances the immunocompetence of shrimp, strengthens antioxidant defenses in the hepatopancreas, and improves resistance to WSSV infection, without adversely affecting the stability of the intestinal microbiota. These findings point to a potential immunoprotective effect of buriti bran when used at an optimal inclusion level, which demonstrates that the shrimp were in generally good health and had robust immunity.

The water quality remained within the tolerable range for *P. vannamei* in both experiments [36], ensuring that observed physiological and immunological outcomes were not confounded by environmental stressors. Notably, no mortality was observed in the B8 group (Experiment 1), and shrimp exhibited the highest survival rate (~ 60%) following WSSV challenge (Experiment 2). In contrast, diets supplemented with pracaxi bran, particularly the P8 formulation, were associated with elevated mortality and weaker immunological responses compared to those supplemented with buriti bran. These findings indicate that not all plant-based feed additives confer equal benefits, highlighting the importance of thoroughly assessing both the dosage and biological activity of novel dietary supplements before their application in aquaculture. A plausible explanation for the adverse effects observed with pracaxi-supplemented diets may be related to the known insecticidal properties of pracaxi.

Previous studies have demonstrated that pracaxi seeds contain bioactive compounds capable of inhibiting the growth of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), reducing cell viability, and specifically suppressing the activity of MG proteases such as trypsin and chymotrypsin in larvae [37]. The insecticidal and larvicidal effects of pracaxi are largely attributed to the presence of monodesmosidic triterpenoid saponins in its seeds, which are cytotoxic compounds [38,39] that have demonstrated strong larvicidal activity against *Aedes aegypti* [40]. Given that these arthropods are closely related, it is conceivable that compounds toxic to insects could similarly affect crustaceans. Notably, this study represents the first documented evaluation of pracaxi bran as a dietary additive in crustaceans, positioning it as a pioneering investigation into its potential effects and risks in shrimp aquaculture.

The B8 diet significantly enhanced some hemato-immunological parameters in shrimp, including phenoloxidase (PO) activity, agglutination titers against a range of marine Gram-positive and Gram-negative bacteria, and total serum protein

concentration. The increase in PO activity and bacterial agglutination indicates an enhancement of the immune responses essential for early antimicrobial defense in crustaceans. PO plays a pivotal role as a key enzyme in the prophenoloxidase (proPO) activation system, which is involved in melanization and wound healing, as well as serving as a critical antimicrobial defense mechanism in crustaceans [10]. Interestingly, elevated PO activity was detected in shrimp after 30 days of feeding with the B8 diet (Experiment 1), but not at day 20 (Experiment 2), suggesting that prolonged dietary supplementation may be more effective in stimulating this immune pathway. Our molecular data support this hypothesis, as PO transcripts were not modulated on 20<sup>th</sup> day. However, both genes encoding prophenoloxidase-activating enzymes (PPAE1 and PPAE2) were upregulated at this time point, preceding the observed increase in PO activity on 30<sup>th</sup> day. This indicates a time lag between gene expression and the activation of functional proteins. This temporal pattern is consistent with previous studies in *P. vannamei*, in which PPAE gene expression preceded PO activity during immune stimulation or pathogen challenge [41].

The strong agglutination exhibited by the serum of B8 shrimp against three Gram-negative marine bacteria, *V. harveyi*, *V. nigripulchritudo*, and *A. hydrophila* was remarkable, considering their pathogenic potential under certain physiological and environmental stress conditions [42–44]. The observed increase in agglutination capacity, particularly against opportunistic marine pathogens, suggests that the B8 diet may bolster the shrimp's ability to recognize and respond effectively to microbial threats, thereby potentially improving resilience to infectious challenges. Lectins, primarily produced by hemocytes and the hepatopancreas, play a central role in host defense by mediating the agglutination of pathogens, thereby facilitating their immobilization and subsequent clearance through phagocytosis [45]. The production of agglutinins and/or lectins in the hemolymph of these animals may have increased. In contrast, the *V. parahaemolyticus* strain not associated with AHPND exhibited limited agglutination, and *L. plantarum* was not agglutinated by the shrimp serum. The lack of agglutination of *L. plantarum* suggests immune tolerance toward this commensal that is a natural member of the intestinal microbiota in penaeid shrimp [46].

The B8 diet was also associated with an improvement in the antioxidant capacity of the hepatopancreas in juvenile *P. vannamei*. Shrimp showed significantly elevated levels of GSH and CAT, accompanied by a reduction in lipid peroxidation, as indicated by lower TBARS. These results suggest that B8 supplementation contributed to the

mitigation of oxidative stress. While increased CAT activity reflects the presence of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), a reactive oxygen species that could initially suggest a pro-oxidant effect, the concurrent rise in GSH and the decline in MDA levels support an overall antioxidant effect in hepatopancreas, as expected from bioactive phytocompounds in buriti. The reduction in lipid peroxidation indicates an effective modulation of the antioxidant defense system in preventing lipid damage in the hepatopancreas. Similar effects were previously reported in *P. vannamei* supplemented with buriti pulp, where increased carotenoid content and antioxidant capacity were observed in the hepatopancreas and muscle, along with reduced lipid peroxidation [21].

The increase in GSH levels observed in this study is likely due to *de novo* synthesis, as regeneration from GSSG typically contributes minimally to intracellular GSH [47]. This synthesis may be triggered by mild oxidative stimuli such as  $H_2O_2$ , which can activate the expression of genes involved in antioxidant responses. Supporting this hypothesis, the SOD activity remained unchanged in this study, suggesting a specific modulation of redox signaling rather than a broad oxidative stress response. The stability of SOD and GST enzymes, along with the presence of chemoprotective molecules such as protein thiols (P-SH), further supports the activation of an adaptive antioxidant response that helps maintain redox balance and minimizes oxidative damage under viral pre-challenge conditions. This antioxidant response is potentially mediated by the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway, which regulates genes such as *gcl*, encoding glutamate-cysteine ligase (GCL), essential for GSH synthesis [48].

Nrf2 is a transcription factor that regulates the cellular defense against toxic and oxidative insults helping the redox homeostasis and increasing resistance to oxidative damage in *P. vannamei* under *V. harveyi* infection [49]. Consistently, B8-fed shrimp maintained stable P-SH, indicating protection of cellular macromolecules. Another study demonstrated that dietary supplementation with buriti pulp has chemoprotective effects in shrimp exposed to environmental stressors such as ammonia and nitrite [50]. Collectively, these findings suggest that dietary supplementation with 8% buriti bran enhances antioxidant defenses in *P. vannamei*, likely via redox-sensitive pathways such as Nrf2, improving cellular protection and potentially bolstering immune performance under stress conditions.

In this study, B8 diet supplementation induced transcriptional changes in several immune-related genes in the shrimp MG, particularly those involved in antioxidant/redox balance, cytokine signaling, antiviral responses, and proPO activation system. Although all 42 genes evaluated were constitutively expressed, only eight exhibited statistically significant differential expression. The expression levels of both PPAE isoformas, PPAE1 and PPAE2, were significantly upregulated. PPAEs are critically involved in antibacterial defense mediated by the proPO system [41], and The upregulation of these genes in the gut epithelium may support localized immune responses and contribute to the maintenance of bacterial eubiosis and epithelial integrity, particularly under dietary stimulation.

In addition, genes involved in homeostasis and oxidative stress regulation were also modulated in shrimp fed B8 diet. TGII, a transglutaminase type II responsible to hemolymph clotting, showed a 4-fold increase in expression, suggesting a B8 diet-induced strengthening of mucosal defenses. The gene encoding TGII is known to be upregulated in response to microbial challenge, underscoring its involvement in pathogen-induced immune responses [51]. Therefore, the modulation of TGII expression by dietary factors may represent an important mechanism through which nutritional interventions enhance immune resilience in shrimp, by promoting rapid coagulation responses following cuticle injury and preventing hemolymph loss.

Likewise, CAT gene was significantly upregulated in shrimp fed the B8-supplemented diet, aligning with our biochemical findings that indicated enhanced catalase activity in the hepatopancreas and a systemic antioxidant response. In contrast, DUOX1, a pro-oxidant enzyme responsible for the generation of reactive oxygen species (ROS) [52] was the only gene significantly upregulated in the control group. This upregulation may represent a compensatory mechanism aimed at maintaining redox homeostasis in the absence of dietary antioxidant support (control diet). Conversely, the downregulation of DUOX1 expression in the B8-fed group may reflect a negative regulatory mechanism aimed at limiting ROS production in the MG during the pre-challenge phase prior to WSSV exposure.

It is noteworthy that gene expression profiling was performed prior to WSSV challenge, a phase during which heightened respiratory burst activity is not typically anticipated. Nonetheless, the higher post-viral challenge survival rate observed in shrimp fed the B8 diet (58% in B8 vs. 33% in C) suggests a more resilient physiological condition, potentially supported by enhanced antioxidant and antiviral defenses.

Supporting this hypothesis, we found a significant upregulation of three antiviral-related transcripts - Vago4, Vago5, and STING - in the B8 group. These cytokine genes are components of an interferon-like signaling cascade that plays a central role in the non-specific activation of antiviral immunity in *P. vannamei*. Specifically, Vago 4/5 proteins have been implicated in the inhibition of viral replication through JAK-STAT pathway activation, while STING acts as a cytosolic DNA [53,54].

In crustaceans, STING is an ortholog recognized as a key adaptor protein in the interferon-like signaling cascade. It is activated upon detection of cytosolic DNA from invading pathogens, such as viruses, and initiates an IFN-like antiviral response [55]. Once activated, STING initiates downstream transcription of immune effectors, including Vago genes and other antiviral cytokines, contributing to an unspecific antiviral state in *P. vannamei*. The upregulation of these genes in B8-fed shrimp suggests that B8 supplementation may enhance immune surveillance and antiviral defense, potentially via activation of the Vago-STING pathway [53,54]. Consequently, the upregulation of these transcripts along with a 25% increase in survival following WSSV challenge, suggests that dietary supplementation with B8 confers an immunoprotective effect that enhances the shrimp's resistance to viral infection.

Although this study did not investigate which specific bioactive components of buriti bran may contribute to the immunostimulatory and immunoprotective effects observed in shrimp, it is well established that buriti fruits contain a wide variety of bioactive substances. These include carotenoids (e.g.,  $\beta$ -carotene), tocopherols (vitamin E), phenolic acids (such as caffeic and ferulic acids), flavonoids (including catechin, epicatechin, luteolin, and quercetin), as well as unsaturated fatty acids like oleic acid [18,56]. The immunostimulatory effects observed are likely attributable to these compounds, particularly carotenoids, tocopherols, and polyphenols, which are well recognized for their antioxidative and immunomodulatory properties [56]. The synergistic action of these bioactive constituents may contribute to the improved immune responses observed in shrimp fed with buriti-supplemented diets.

Despite the immunostimulatory and protective effects elicited by the B8 diet, no significant alterations were observed in the MG microbial composition or absolute abundance of evaluated bacterial taxa. This microbial stability is a positive outcome, as diet-induced dysbiosis can negatively affect host health and immune function. Comparable studies in fish have shown that plant-based diets often lead to shifts in gut

microbiota, sometimes reducing beneficial taxa or favoring opportunistic pathogens [57].

In summary, our study demonstrates that dietary supplementation with 8% buriti bran significantly enhances immune responses, antioxidant defenses, and antiviral protection in juveniles *P. vannamei*, as evidenced by increased survival following WSSV challenge. Gene expression analyses revealed the upregulation of key immune and antiviral-related genes, suggesting that the B8 diet primes multiple protective pathways. Importantly, these immunological benefits were achieved without disrupting the composition or abundance of the gut microbiota. Notably, the buriti bran used was derived from agro-industrial by-products, offering a sustainable solution that aligns with circular economy principles and supports the objectives of the “Blue Amazon” initiative by promoting environmentally responsible aquaculture. These findings support the buriti bran as a functional and eco-friendly ingredient in shrimp aquafeeds, with future studies needed to confirm its efficacy against bacterial infections and under commercial farming conditions.

### **Acknowledgement**

The authors would like to thank the Laboratory of Marine Shrimp at the Federal University of Santa Catarina (Brazil) for providing the animals and Dr Paulina Schmitt (PUC, Valparaíso, Chile) for generously donating the plasmids used for 16S rRNA quantification. We would also like to thank Sarah K. O. Cabral (MSc, Group of Plant Molecular Biology, UFSC) and the Multiuser Laboratory of Biological Studies (LAMEB, UFSC) for their technical support. This study was supported by the following Brazilian funding agencies: the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Finance Code 001), Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) (Grant number 2024TR002493), and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq – Grant number 312047/2021-5). J. S. A., Rebouças Jr., L. Müller and V. D. Oliveira received scholarships from CAPES. A.O. Vieira and E.M. Rubas received scholarships from FAPESC and CNPq-PIBIC, respectively.

## REFERENCES

- [1] C.E. Boyd, A.A. McNevin, R.P. Davis, The contribution of fisheries and aquaculture to the global protein supply, *Food Secur.* 14 (2022) 805–827. <https://doi.org/10.1007/s12571-021-01246-9>.
- [2] A.T. Mansour, M. Ashour, A.E. Alprol, A.S. Alsaqufi, Aquatic Plants and Aquatic Animals in the Context of Sustainability: Cultivation Techniques, Integration, and Blue Revolution, *Sustain.* 14 (2022) 3257. <https://doi.org/10.3390/su14063257>.
- [3] G. Bardera, N. Usman, M. Owen, D. Pountney, K.A. Sloman, M.E. Alexander, The importance of behaviour in improving the production of shrimp in aquaculture, *Rev. Aquac.* 11 (2019) 1104–1132. <https://doi.org/10.1111/raq.12282>.
- [4] Y.H. Chen, J.G. He, Effects of environmental stress on shrimp innate immunity and white spot syndrome virus infection, *Fish Shellfish Immunol.* 84 (2019) 744–755. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2018.10.069>.
- [5] D. Lee, Y. Bin Yu, J.H. Choi, A.H. Jo, S.M. Hong, J.C. Kang, J.H. Kim, Viral Shrimp Diseases Listed by the OIE: A Review, *Viruses.* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/v14030585>.
- [6] C.M. Escobedo-Bonilla, V. Alday-Sanz, M. Wille, P. Sorgeloos, M.B. Pensaert, H.J. Nauwynck, Review A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus, *J. Fish Dis.* 31 (2008) 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00877.x>.
- [7] M.R. Pilotto, A.N.A. Goncalves, F.N. Vieira, W.Q. Seifert, E. Bachère, R.D. Rosa, L.M. Perazzolo, Exploring the impact of the biofloc rearing system and an oral WSSV challenge on the intestinal bacteriome of *Litopenaeus vannamei*, *Microorganisms.* 6 (2018) 83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030083>.
- [8] V. Kumar, S. Roy, B.K. Behera, P. Bossier, B.K. Das, Acute hepatopancreatic necrosis disease (Ahpnd): Virulence, pathogenesis and mitigation strategies in Shrimp aquaculture, *Toxins (Basel).* 13 (2021) 524. <https://doi.org/10.3390/toxins13080524>.
- [9] N.D. Farias, M. Falchetti, G.M. Matos, P. Schmitt, C. Barreto, N. Argenta, J.-L. Rolland, E. Bachère, L.M. Perazzolo, R.D. Rosa, *Litopenaeus vannamei* stylisticins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections, *Fish Shellfish Immunol.* 86 (2019) 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.021>.
- [10] L. Cerenius, K. Söderhäll, Immune properties of invertebrate phenoloxidases, *Dev. Comp. Immunol.* 122 (2021) 104098. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104098>.
- [11] S. Liu, S.C. Zheng, Y.L. Li, J. Li, H.P. Liu, Hemocyte-Mediated Phagocytosis in Crustaceans, *Front. Immunol.* 11 (2020) 268. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00268>.

- [12] G.M. Matos, R.D. Rosa, On the silver jubilee of crustacean antimicrobial peptides, *Rev. Aquac.* 14 (2021) 594–612. <https://doi.org/10.1111/raq.12614>.
- [13] A. Kulkarni, S. Krishnan, D. Anand, S. Kokkattunivarthil Uthaman, S.K. Otta, I. Karunasagar, R. Kooloth Valappil, Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp, *Rev. Aquac.* 13 (2021) 431–459. <https://doi.org/10.1111/raq.12482>.
- [14] Y. Gong, X. Zhang, RNAi-based antiviral immunity of shrimp, *Dev. Comp. Immunol.* 115 (2021) 103907. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103907>.
- [15] S. Vijayaram, Y.Z. Sun, A. Zuurro, H. Ghafarifarsani, H. Van Doan, S.H. Hoseinifar, Bioactive immunostimulants as health-promoting feed additives in aquaculture: A review, *Fish Shellfish Immunol.* 130 (2022) 294–308. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.09.011>.
- [16] M.I. Yasin Saleh, Sukenda, Widanarni, A. Jayanegara, Survival, immune response and growth of Penaeid shrimp as affected by immunostimulants: A meta-analysis, *Fish Shellfish Immunol.* 148 (2024) 109507. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2024.109507>.
- [17] L. Seong Wei, S.A. Mohamad Sukri, A.B. Tahiluddin, Z. Abdul Kari, W. Wee, M.A. Kabir, Exploring beneficial effects of phytobiotics in marine shrimp farming: A review, *Heliyon.* 10 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31074>.
- [18] J.A.P. Freire, K.B.N.T. Barros, L.K.F. Lima, J.M. Martins, Y. de C. Araújo, G.L. da Silva Oliveira, J. de Souza Aquino, P.M.P. Ferreira, Phytochemistry Profile, Nutritional Properties and Pharmacological Activities of *Mauritia flexuosa*, *J. Food Sci.* 81 (2016) R2611–R2622. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13529>.
- [19] M.L. Nobre Lamarão, L.M. de M.C. Ferreira, D. Gyles Lynch, L.R.B. Morais, J.O.C. Silva-Júnior, R.M. Ribeiro-Costa, *Pentaclethra macroloba*: A Review of the Biological, Pharmacological, Phytochemical, Cosmetic, Nutritional and Biofuel Potential of this Amazonian Plant., *Plants (Basel, Switzerland).* 12 (2023) 1330. <https://doi.org/10.3390/plants12061330>.
- [20] M.G.C. Emerenciano, A.N. Rombenso, F.D.N. Vieira, M.A. Martins, G.J. Coman, H.H. Truong, T.H. Noble, C.J. Simon, Intensification of Penaeid Shrimp Culture: An Applied Review of Advances in Production Systems, Nutrition and Breeding, *Animals.* 12 (2022) 236. <https://doi.org/10.3390/ani12030236>.
- [21] C. dos S. Simião, G.M. Colombo, M.J. Schmitz, P.B. Ramos, M.B. Tesser, W. Wasielesky, J.M. Monserrat, Inclusion of Amazonian *Mauritia flexuosa* fruit pulp as functional feed in the diet for the juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Aquac. Res.* 51 (2020) 1731–1742. <https://doi.org/10.1111/are.14520>.
- [22] M.R. Pilotto, S. Milanez, R.T. Moreira, R.D. Rosa, L.M. Perazzolo, Potential immunomodulatory and protective effects of the *Arthrospira*-based dietary supplement on shrimp intestinal immune defenses, *Fish Shellfish Immunol.* 88 (2019) 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.062>.

- [23] A.S. Silveira, G.M. Matos, M. Falchetti, F.S. Ribeiro, A. Bressan, E. Bachère, L.M. Perazzolo, R.D. Rosa, An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity, *Dev. Comp. Immunol.* 79 (2018) 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.10.005>.
- [24] J. do Nascimento Ferreira, T.R. Gagliardi, F.N. Vieira, C.P. Martins, R.D. Rosa, L.M. Perazzolo, Assessing the impact of chemoautotrophic and heterotrophic biofloc cultivation systems on the immunity and intestinal bacteriome of shrimp, *Aquac. Int.* 32 (2024) 4647–4663. <https://doi.org/10.1007/s10499-024-01394-7>.
- [25] L.M. Perazzolo, M.A. Barracco, The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors, *Dev. Comp. Immunol.* 21 (1997) 385–395. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(97\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(97)00022-0).
- [26] E. Beutler, B. Beutler, F. Matsumoto, Glutathione Peroxidase Activity of Inorganic Selenium and Seleno-DL-Cysteine, 31 (1975) 769–770.
- [27] J.M. McCords, I. Fridovich, Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)\*, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 6049–6065. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5).
- [28] W.H. Habig, W.B. Jakoby, Assays for Differentiation of Glutathione S-Transferases, *Methods Enzymol.* 77 (1981) 398–405. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77053-8).
- [29] J. Sedlak, R.H. Lindsay, Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, *Anal. Biochem.* 25 (1968) 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4).
- [30] K.D. Oakes, G.J. Van Der Kraak, Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent, *Aquat. Toxicol.* 63 (2003) 447–463. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00204-7).
- [31] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  method, *Methods.* 25 (2001) 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [32] T. Metsalu, J. Vilo, ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) W566–W570. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv468>.
- [33] T. Bacchetti De Gregoris, N. Aldred, A.S. Clare, J.G. Burgess, Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa, *J. Microbiol. Methods.* 86 (2011) 351–356. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2011.06.010>.
- [34] R. González, A.T. Gonçalves, R. Rojas, K. Brokordt, R.D. Rosa, P. Schmitt, Host Defense Effectors Expressed by Hemocytes Shape the Bacterial Microbiota From the Scallop Hemolymph, *Front. Immunol.* 11 (2020) 599625. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599625>.

- [35] C.C. Holt, D. Bass, G.D. Stentiford, M. van der Giezen, Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease, *J. Invertebr. Pathol.* 186 (2021) 107387. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107387>.
- [36] P.M. Van Wyk, J. Scarpa, Water Quality Requirements and Standards, in: *Qual. Assess. Water Wastewater*, 4520th ed., 1999: pp. 141–162. <https://doi.org/10.1201/9781482264470-14>.
- [37] J. Chun, C.L. Goodman, W.C. Rice, A.H. McIntosh, G.M. Chippendale, K.R. Schubert, *Pentaclethra macroloba* seed effect on larval growth, cell viability, and midgut enzyme activity of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), *J. Econ. Entomol.* 87 (1994) 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/jee/87.6.1754>.
- [38] A. Balestrazzi, A. Macovei, A. Tava, P. Avato, E. Raimondi, D. Carbonera, Unraveling the response of plant cells to cytotoxic saponins: Role of metallothionein and nitric oxide, *Plant Signal. Behav.* 6 (2011) 516–519. <https://doi.org/10.4161/psb.6.4.14746>.
- [39] G.L. Teixeira, L.G. Maciel, S. Mazzutti, C.B. Gonçalves, S.R.S. Ferreira, J.M. Block, Composition, thermal behavior and antioxidant activity of pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) seed oil obtained by supercritical CO<sub>2</sub>, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 24 (2020) 101521. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101521>.
- [40] G.M.P. Santiago, F.A. Viana, O.D.L. Pessoa, R.P. Santos, Y.B.M. Pouliquen, A.M.C. Arriaga, M. Andrade-Neto, R. Braz-Filho, Evaluation of larvicidal activity of triterpenoid saponins of *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) isolated and *Cordia piauiensis* Fresen (Boraginaceae) against *Aedes aegypti*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 15 (2005) 187–190.
- [41] Z. Pang, S.K. Kim, J. Yu, I. kwon Jang, Distinct regulation patterns of the two prophenoloxidase activating enzymes corresponding to bacteria challenge and their compensatory over expression feature in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), *Fish Shellfish Immunol.* 39 (2014) 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.026>.
- [42] M.S. Morales-Covarrubias, J. Cuéllar-Anjel, A. Varela-Mejías, C. Elizondo-Ovares, Shrimp bacterial infections in latin America: A review, *Asian Fish. Sci.* 31 (2019) 76–87. <https://doi.org/10.33997/j.afs.2018.31.s1.005>.
- [43] C. Goarant, D. Ansquer, J. Herlin, D. Domalain, F. Imbert, S. De Decker, “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*, *Aquaculture.* 253 (2006) 105–113. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2005.07.031>.
- [44] S. Kawato, J. Lu, R. Nozaki, H. Kondo, I. Hirono, Genome Sequence of *Vibrio nigripulchritudo* Strain TUMSAT-TG- 2018, Isolated from Diseased Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, *Microbiol. Resour. Announc.* 9 (2018) 10.1128. <https://doi.org/doi.org/10.1128/MRA.01206-20>.
- [45] X.W. Wang, G.R. Vasta, J.X. Wang, The functional relevance of shrimp C-type lectins in host-pathogen interactions, *Dev. Comp. Immunol.* 109 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103708>.

- [46] K. Kongnum, T. Hongpattarakere, Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*, Fish Shellfish Immunol. 32 (2012) 170–177. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2011.11.008>.
- [47] C.C. White, H. Viernes, C.M. Krejsa, D. Botta, T.J. Kavanagh, Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity, Anal. Biochem. 318 (2003) 175–180. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00143-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00143-X).
- [48] C. Tonelli, I.I.C. Chio, D.A. Tuveson, Transcriptional Regulation by Nrf2, Antioxidants Redox Signal. 29 (2018) 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7342/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE6.JPEG>.
- [49] Y. Yuan, H. Guan, Y. Huang, J. Luo, J. Jian, S. Cai, S. Yang, Involvement of Nrf2 in the immune regulation of *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio harveyi* infection, Fish Shellfish Immunol. 133 (2023) 108547. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108547>.
- [50] C.D.S. Simião, G.M. Colombo, R.M.M. Gomes, P.B. Ramos, M.B. Tesser, W. Wasielesky Junior, J.M. Monserrat, Chemoprotection of amazonian *Mauritia flexuosa* fruit pulp against ammonia and nitrite toxicity to postlarvae shrimps *Litopenaeus vannamei*, Bol. Do Inst. Pesca. 48 (2022). <https://doi.org/10.20950/1678-2305/bip.2022.48.e679>.
- [51] M.S. Yeh, W.L. Tsai, W. Cheng, Identification and cloning of the second type transglutaminase from *Litopenaeus vannamei*, and its transcription following pathogen infection and in relation to the haemolymph coagulation, Fish Shellfish Immunol. 35 (2013) 1613–1623. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2013.09.002>.
- [52] Y. Chen, B.J. Wang, M.Q. Wang, M. Liu, K.Y. Jiang, L. Wang, Molecular characterization of the dual oxidase (LvDuox) gene from the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Invertebr. Surviv. J. 15 (2018) 316–326.
- [53] C. Li, H. Li, Y. Chen, Y. Chen, S. Wang, S.P. Weng, X. Xu, J. He, Activation of Vago by interferon regulatory factor (IRF) suggests an interferon system-like antiviral mechanism in shrimp, Sci. Rep. 5 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep15078>.
- [54] H. Li, X. Di, S. Wang, Q. Li, S. Weng, J. He, C. Li, Nucleic Acid Sensing by STING Induces an IFN-like Antiviral Response in a Marine Invertebrate, J. Immunol. 212 (2024) 1945–1957. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.2300669>.
- [55] P. Amparyup, W. Charoensapsri, S. Soponpong, M. Jearaphunt, R. Wongpanya, A. Tassanakajon, Stimulator of interferon gene (STING) and interferon regulatory factor (IRF) are crucial for shrimp antiviral defense against WSSV infection, Fish Shellfish Immunol. 117 (2021) 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.08.016>.
- [56] N.R.R. do Nascimento Silva, R.B.M. Cavalcante, F.A. da Silva, Nutritional properties of Buriti (*Mauritia flexuosa*) and health benefits, J. Food Compos.

Anal. 117 (2023) 105092. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2022.105092>.

- [57] S. Miao, C. Zhao, J. Zhu, J. Hu, X. Dong, L. Sun, Dietary soybean meal affects intestinal homeostasis by altering the microbiota, morphology and inflammatory cytokine gene expression in northern snakehead, *Sci. Rep.* 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-18430-7>.

## ARTIGO CIENTÍFICO 2

Neste capítulo será apresentado o segundo artigo científico que apresenta e discute resultados sobre a avaliação do potencial imunomodulador e estimulante de outra dieta contendo um aditivo de planta amazônica: 8% de farelo de açaí (*Euterpe oleraceae*). Neste caso, o desenho experimental foi semelhante ao anteriormente descrito, sendo que após 20 dias de suplementação alimentar, avaliou-se diferentes parâmetros bioquímicos nos camarões referentes à capacidade antioxidante do hepatopâncreas, modulação de genes associados ao sistema imune e quantificação absoluta de alguns grupos bacterianos no intestino médio. Além disso, o potencial efeito imunoprotetor da dieta acrescida de 8% de farelo de açaí foi avaliada mediante a taxa de sobrevivência dos camarões desafiados via sistêmica com WSSV após 30 dias de suplementação alimentar.

Os resultados serão submetidos à publicação no periódico *Aquaculture International* (<https://link.springer.com/journal/10499>)

**Suplementação dietética com farelo de açaí promove modulação seletiva do eixo imune-redox e do equilíbrio fisiológico em *Penaeus vannamei***

**Título em inglês:** Dietary açai meal supplementation promotes selective immune–redox modulation and physiological balance in *Penaeus vannamei*

José Stênio A. Rebouças<sup>1</sup>, Abdon de O. Vieira<sup>1</sup>; Doris S. M. Souza<sup>1</sup>, Sarah K.O. Cabral<sup>2</sup>, Larissa Müller<sup>3</sup>, Vitória D. de Oliveira<sup>4</sup>, Juliane V. Lima<sup>3</sup>, Felipe W. Mendonça<sup>5</sup>, Franceli R. Kulcheski<sup>2</sup>, Rafael D. Rosa<sup>1</sup>, Luciane M. Perazzolo<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88035-972 Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>2</sup> Grupo de Biologia Molecular Vegetal, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88035-972, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório de Nutrição de Espécies Aquáticas, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 88035-972, Florianópolis, Brasil.

<sup>5</sup> Prospera Nutrição & Consultoria LTDA, Avenida Campeche 2930, Unidade 203, 88063-301, Florianópolis, SC, Brasil.

\* Corresponding author: Tel: +55 48 48 37 3721 4196; Fax: +55 48 48 3721 5528  
E-mail: l.m.perazzolo@ufsc.br (L.M.Perazzolo)

## Resumo

Dietas funcionais enriquecidas com compostos bioativos vegetais têm sido amplamente investigadas como estratégias para modular a imunocompetência e o equilíbrio fisiológico em animais aquáticos, representando uma abordagem promissora para a prevenção de doenças e o desenvolvimento sustentável da aquicultura. Neste estudo, foram avaliados os efeitos da suplementação dietética com 8% de farelo de açaí (A8) sobre a capacidade antioxidante do hepatopâncreas, o perfil transcricional e a plasticidade de microbiota bacteriana no intestino médio de *Penaeus vannamei*. Camarões juvenis foram alimentados com dietas controle ou suplementada por 20 dias, sendo posteriormente analisada a expressão relativa de 42 genes associados à imunidade. Dentre esses, apenas DUOX1, Pelle, STING e glutathione peroxidase (GPx) apresentaram expressão diferencial. A dieta A8 promoveu redução significativa da expressão do gene DUOX1, enquanto Pelle, STING e GPx apresentaram aumento moderado da expressão em comparação ao grupo controle. As análises bioquímicas revelaram menores níveis de TBARS, indicando redução da peroxidação lipídica no hepatopâncreas, bem como um aumento de 2,2 vezes na atividade da catalase, refletindo maior capacidade antioxidante nos camarões suplementados. A comunidade bacteriana do intestino médio permaneceu estável, corroborando a segurança da suplementação dietética com farelo de açaí. Em um ensaio subsequente, camarões alimentados por 30 dias com a dieta A8 foram desafiados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) por via sistêmica, utilizando-se uma dose letal mediana (DL50/15) e não foram observadas diferenças significativas nas taxas de sobrevivência entre os grupos suplementado e controle. De forma integrada, os resultados demonstram que a suplementação dietética com farelo de açaí promoveu modulação seletiva do eixo imune-redox, associada ao fortalecimento das defesas antioxidantes, à redução do estresse oxidativo e à manutenção do equilíbrio fisiológico, sem conferir, contudo, resistência à infecção sistêmica por WSSV. Esses achados indicam que a suplementação com a dieta A8 propiciou uma homeostase redox e na citoproteção tecidual, contribuindo para a melhoria da qualidade fisiológica dos camarões. Além disso, o uso do farelo de açaí, um subproduto agroindustrial rico em compostos bioativos, reforça os princípios da economia circular e evidencia o potencial de recursos naturais amazônicos para o desenvolvimento de rações funcionais sustentáveis na carcinicultura.

**Palavras-chave:** Carcinicultura; *Euterpe oleraceae*; modulação imune-redox; dieta funcional; imunidade intestinal.

## Abstract

Functional diets enriched with plant bioactive compounds have been widely investigated as strategies to modulate immunocompetence and physiological balance in aquatic animals, representing a promising approach to disease prevention and sustainable aquaculture development. In this study, the effects of dietary supplementation with 8% açai meal (A8) on the antioxidant capacity of the hepatopancreas, the transcriptional profile and the plasticity of bacterial microbiota in the midgut of *Penaeus vannamei* were evaluated. Juvenile shrimp were fed control diets or supplemented for 20 days, and the relative expression of 42 genes associated with immunity was subsequently analyzed. Among these, only DUOX1, Pelle, STING and glutathione peroxidase (GPx) showed differential expression. The A8 diet promoted a significant reduction in the expression of the DUOX1 gene, while Pelle, STING and GPx showed a moderate increase in expression compared to the control group. Biochemical analyses revealed lower levels of TBARS, indicating a reduction in lipid peroxidation in the hepatopancreas, as well as a 2.2-fold increase in catalase activity, reflecting greater antioxidant capacity in the supplemented shrimp. The bacterial community of the midgut remained stable, corroborating the safety of dietary supplementation with açai meal. In a subsequent trial, shrimp fed for 30 days on the A8 diet were challenged with white spot syndrome virus (WSSV) systemically, using a median lethal dose (LD<sub>50</sub>/15) and no significant differences were observed in survival rates between the supplemented and control groups. In an integrated way, the results demonstrate that dietary supplementation with açai meal promoted selective modulation of the immune-redox axis, associated with the strengthening of antioxidant defenses, the reduction of oxidative stress and the maintenance of physiological balance, without, however, conferring resistance to systemic infection by WSSV. These findings indicate that supplementation with the A8 diet provided redox homeostasis and tissue cytoprotection, contributing to the improvement of the physiological quality of shrimp. In addition, the use of açai meal, an agro-industrial by-product rich in bioactive compounds, reinforces the principles of the circular economy and highlights the potential of Amazonian natural resources for the development of sustainable functional rations in shrimp farming.

**Keywords:** Shrimp farming; *Euterpe oleraceae*; immune-redox modulation; functional diet; intestinal immunity.

## INTRODUÇÃO

A aquicultura é um dos setores de produção de alimentos que mais crescem no mundo, impulsionada pelo desenvolvimento de tecnologias e pela intensificação dos sistemas de produção animal (VERDEGEM et al., 2023). Atualmente, a atividade constitui uma das principais alternativas para atender à demanda por alimentos de forma sustentável, sendo inclusive referida como a “revolução azul” (MANSOUR et al., 2022). A espécie *Penaeus vannamei* é cultivada em diversas regiões do mundo em função de suas excelentes características zootécnicas, como boa taxa de conversão alimentar, rápido crescimento e elevada fecundidade (BRIGGS et al., 2004). Entretanto, o equilíbrio dos sistemas aquícolas é bastante sensível, e condições climáticas adversas, associadas a variações abruptas da qualidade da água, podem comprometer o sistema imune dos camarões e torná-los particularmente suscetíveis a enfermidades que impactam o sucesso da produção (PAUL and VOGL, 2011).

Na criação de peneídeos, viroses e bacterioses constituem os principais grupos de doenças que afetam e comprometem economicamente a atividade (LIGHTNER, et al. 2012; KIBENGGE, 2019). O vírus da síndrome da mancha branca (*white spot syndrome virus*, WSSV) é considerado o patógeno mais relevante para a carcinicultura em escala mundial, sendo responsável por dizimar populações inteiras desde a sua emergência em 1992 (FLEGEL, 2012). Esse vírus é capaz de infectar todos os crustáceos da ordem Decapoda, alcançando células de diferentes tecidos (KOU et al. 1998). No caso das bacterioses, todos os crustáceos aquáticos são suscetíveis à infecção por vibrios, e perdas substanciais de produção são frequentemente observadas em decorrência de surtos de vibrioses e de enfermidades como a doença da necrose hepatopancreática aguda (*acute hepatopancreatic necrosis disease*, AHPND), que têm afetado a produção de camarões comerciais, como *Penaeus monodon* e *P. vannamei* (KONDO et al., 2015).

Os camarões dependem exclusivamente da imunidade inata como principal linha de defesa, a qual compreende uma rede altamente integrada de mecanismos celulares e humorais. Essa resposta é iniciada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos por receptores e proteínas de reconhecimento (PRRs/PRPs), seguido pela ativação de vias de sinalização intracelular que modulam respostas efetoras (CERENIUS & SÖDERHÄLL, 2021). Entre estas, destacam-se processos como fagocitose, encapsulação e nodulação, frequentemente associados

à formação de armadilhas extracelulares (ETose), bem como a produção de moléculas microbidas, incluindo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e peptídeos antimicrobianos (LIU et al., 2020; MATOS et al., 2023). Adicionalmente, incluem-se a ativação do sistema pro-fenoloxidase (proPO), responsável pela melanização e geração de intermediários citotóxicos (CERENIUS & SÖDERHÄLL, 2021), a coagulação da hemolinfa mediada por transglutaminases, a aglutinação celular dependente de lectinas e mecanismos antivirais mediados por interferência por RNA (RNAi), citocinas do tipo interferon, apoptose e autofagia (GONG & ZHANG, 2021; KULKARNI et al., 2021).

A ausência de um sistema imune adaptativo impede o uso de vacinas ou de terapias baseadas no reconhecimento específico de patógenos para prevenir infecções recorrentes em camarões (FLEGEL 2012). Dessa forma, torna-se fundamental adotar medidas profiláticas que favoreçam o controle da ocorrência de doenças durante o cultivo, bem como o uso de substâncias imunoestimulantes capazes de aumentar a imunocompetência dos animais e reduzir sua suscetibilidade a patógenos. Nesse contexto, ingredientes fornecidos na ração na forma de extratos vegetais brutos ou purificados, incluindo aqueles provenientes do bioma amazônico, apresentam potencial interesse para a carcinicultura brasileira. Entre esses ingredientes, destaca-se a inclusão de farelos de plantas amazônicas, como o açaí (*Euterpe oleraceae*), devido à presença de compostos bioativos e a propriedades nutraceuticas já descritas. O fruto do açaí é considerado uma importante fonte nutricional por ser rico em vitaminas e minerais, além de conter compostos bioativos, como pigmentos, flavonoides, carboidratos, esteróis e ácidos graxos (NERI-NUMA et al. 2018). A análise de sua composição evidencia elevados teores de ácidos graxos (ômega 6 e 9), carboidratos, fibras, vitaminas (A, C, D e E), proteínas, minerais (Mn, Fe, Zn, Cu e Cr) e antioxidantes (DEMBITSKY et al., 2011; GORDON et al., 2012; SCHAUSS, 2016). Dentre os compostos bioativos identificados no açaí, destacam-se produtos fenólicos, flavonoides e antocianinas, que apresentam propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias em humanos (SCHAUSS, 2016). Além das ações antioxidante e anti-inflamatória, são atribuídos a flavonoides presentes no açaí protegem contra a neurodegeneração e possui efeitos antimutagênicos e antimicrobianos (NILE e PARK, 2014).

A composição da polpa do açaí e a do farelo decorre do fato de que se tratam de matrizes distintas ao longo da cadeia de processamento. Enquanto a fração

comestível é descrita como alimento de alta densidade energética e compostos bioativos, o subproduto obtido após o despulpamento e a prensagem a frio para extração de óleo passa a apresentar uma composição proximal e química diferente, com redução relativa da fração lipídica e enriquecimento no teor de fibras, contrastando com a composição da fração do fruto tradicionalmente consumida (MELO et al., 2012).

Apesar do potencial imunoestimulante desses ingredientes, não há registros, na literatura, de estudos que avaliem o efeito da suplementação dietética de camarões *P. vannamei* com açaí sobre a imunocompetência e a resistência a infecções virais. Com o intuito de preencher essa lacuna de conhecimento, o presente estudo teve como objetivo avaliar a imunocompetência de juvenis de *P. vannamei* alimentados com dieta suplementada com farelo de açaí, por meio de análises hematoimunológicas de diferentes imunoparâmetros, determinação da capacidade antioxidante, análises biomoleculares e de um desafio viral para mensurar o potencial efeito protetor do farelo de açaí. Estudos dessa natureza podem contribuir para o controle e a prevenção de doenças em sistemas de cultivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1.1.17 Confeção e composição da dieta

As dietas experimentais foram formuladas e produzidas pela empresa Alcon® Ltda (Indústria e Comércio de Alimentos Desidratados), utilizando-se a ração comercial Alcon® Shrimp Nano Stick como dieta basal. O ingrediente vegetal suplementar consiste em farelo de açaí (*Euterpe oleracea*), fornecido pela Prospera Nutri®. Todas as dietas foram formuladas de modo a serem isoenergéticas e isoproteicas, garantindo a consistência nutricional entre os tratamentos. O farelo de fruto utilizado nas formulações corresponde a um subproduto desidratado obtido por extração a frio do óleo, processo mecânico que inclui a moagem da casca, da polpa e das sementes. Habitualmente gerado como resíduo pela indústria de cosméticos, esse material foi reaproveitado no presente estudo como ingrediente sustentável para rações aquícolas. A formulação e a composição centesimal das dietas (**Tabela 4**) seguiram as exigências nutricionais mínimas recomendadas para *P. vannamei* mantidos em sistemas de recirculação em aquicultura (*recirculating aquaculture*

systems, RAS), de acordo com as diretrizes do *International Aquaculture Feed Formulation Database* (IAFFD) (EMERENCIANO et al., 2022).

**Tabela 4.** Formulação e composição da dieta basal e experimental. A quantidade de cada ingrediente é apresentada como valores percentuais (%) na composição úmida das dietas.

| Ingredientes                 | Inclusão de Ingredientes (%)  |                                 |
|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
|                              | Dieta de controle<br><b>C</b> | Dieta experimental<br><b>A8</b> |
| Farinha de soja              | 32,03                         | 29,47                           |
| Farinha de milho             | 30,69                         | 28,23                           |
| Spirulina desidratada*       | 12                            | 11,04                           |
| Farinha de peixe             | 10                            | 9,20                            |
| Farinha de lula              | 5                             | 4,60                            |
| Levedura                     | 3,65                          | 3,36                            |
| Óleo de soja refinado        | 2,18                          | 2,01                            |
| Amido de mandioca            | 1,07                          | 0,98                            |
| Vitamina-mineral premix      | 0,85                          | 0,78                            |
| Mineral premix               | 0,8                           | 0,74                            |
| Cloreto de sódio             | 0,6                           | 0,55                            |
| Óleo de peixe                | 0,59                          | 0,54                            |
| Aditivo enzimático           | 0,35                          | 0,32                            |
| Aditivo prebiótico           | 0,11                          | 0,10                            |
| Antioxidantes                | 0,05                          | 0,05                            |
| Extrato de mandioca          | 0,03                          | 0,03                            |
| Farelo de açaí               | -                             | 8                               |
| <b>Composição da dieta</b>   |                               |                                 |
| Dieta basal                  | 100                           | 92                              |
| Farelo de açaí               | -                             | 8                               |
| <b>Composição centesimal</b> |                               |                                 |
| Matéria seca                 | 92,34                         | 92,43                           |
| Proteína bruta               | 35,11                         | 33,27                           |
| Extrato Etéreo               | 5,61                          | 8,66                            |
| Matéria fibrosa              | 2,42                          | 3,43                            |
| Cinzas (matéria mineral)     | 7,92                          | 7,63                            |
| Energia metabolizável**      | 3.513                         | 3688                            |

**C:** Alcon® Shrimp Nano Stick

**A8:** dieta acrescida de farelo de açaí a 8% ().

\**Arthrospira platensis*.

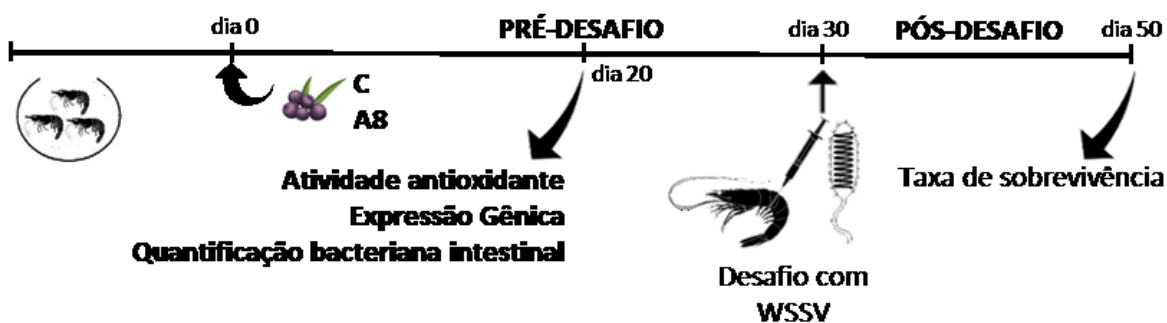
\*\*kcal/kg

### 1.1.18 Animais e Desenho Experimental

Juvenis de camarão *P. vannamei* ( $12 \pm 2,4$  g), de ambos os sexos, aparentemente saudáveis e em estágio de intermuda, foram fornecidos pelo Laboratório de Camarão Marinho (LCM, UFSC) e transportados para as instalações de aquário do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA, UFSC). Os camarões foram distribuídos aleatoriamente em tanques com dimensões 27,5 x 26 x 44,5 cm (10 animais por tanque), contendo 25 L de água do mar (salinidade: 35 g.L<sup>-1</sup>) mantido em um sistema de recirculação fechado sob aeração constante (oxigênio dissolvido > 5 mg/L) e temperatura ( $29 \pm 1$  °C). Os índices de nitrogênio de amônia total (TAN em mg/L), nitrito (N-NO<sub>2</sub> em mg/L), alcalinidade (CaCO<sub>3</sub> em mg/L), salinidade (g/L) e pH foram monitorados constantemente. Camarões eram alimentados duas vezes ao dia (às 8 h e 17 h) a uma taxa de 3-4% de sua biomassa viva (WYK e SCARPA, 1999).

Um total de 120 camarões foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos, cada um composto por seis réplicas (10 animais por réplica, 60 animais por grupo), e alimentados por 50 dias de acordo com a dieta experimental (10 camarões/réplica/tratamento; 30 camarões/grupo): **C** (dieta controle: Alcon® Shrimp Nano Sticks); **A8** (dieta suplementada com 8% de farelo de açaí). Essa concentração foi escolhida com base em um estudo anterior com inclusão na dieta de 10% de extrato de açaí liofilizado (COLOMBO et al., 2020) e testes preliminares com farelo de açaí em diferentes concentrações pelo próprio grupo. No dia 20, metade dos camarões de cada grupo foi eutanasiada para coleta de tecidos e subsequentes análises bioquímicas e moleculares. Esse período inicial de suplementação, chamado de fase pré-desafio, foi utilizado para avaliar o estado geral de saúde e imunológico dos camarões alimentados com a dieta A8. No 30º dia de suplementação alimentar, 15 camarões de cada grupo foram desafiados com WSSV e a suplementação foi mantida até o final do experimento (dia 50). O desafio viral foi realizado por injeção intramuscular de 50 µL no primeiro segmento dorsal contendo  $3 \times 10^3$  cópias virais (WSSV), correspondente à uma dose letal de 50% dos animais em 15 dias (DL<sub>50/15</sub>) (PILOTTO et al. 2019). Camarões do grupo controle foram simultaneamente injetados com o veículo, Tris-NaCl (20 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4). A mortalidade foi diariamente registrada e a taxa de sobrevivência plotada em gráfico Kaplan-Meier. Detalhes do desenho experimental estão ilustrados na **Figura 6**.

**Figura 6.** Esquema do desenho experimental.



Avaliação do efeito imunoprotetor associado à suplementação alimentar dos camarões com dietas acrescidas de farelo de açaí a 8% (**A8**) e sem suplementação (**C**: Alcon® Shrimp Nano Sticks). Após a aclimação dos animais por sete dias, iniciou-se (**Dia 0**) a alimentação com dieta controle (**C**) ou com farelo de açaí (**A8**) a 8%. **Dia 20**: Coleta do hepatopâncreas e intestino médio (IM) para análises bioquímicas (capacidade antioxidante) e moleculares (expressão de genes associados ao sistema imune), bem como quantificação bacteriana (IM). **Dia 30**: desafio com WSSV ( $DL_{50/15}$ ) e verificação da mortalidade até o **50º dia** de suplementação alimentar.

#### 1.1.19 Coleta de tecidos

Os camarões do experimento foram eutanasiados por choque hipotérmico (banho de gelo por 15 minutos) para amostragem do intestino médio (MG) e hepatopâncreas, conforme descrito por (SILVEIRA et al. 2018). Os intestinos médios foram coletados e agrupados em *pools* de três amostras, totalizando quatro *pools* de três intestinos médios por condição experimental. Após a remoção cuidadosa do conteúdo luminal e lavagem com tampão Tris-salina (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7,4), cada *pool* foi acrescido de RNeasy Lysis Buffer (Invitrogen) na proporção de 0,5 g de tecido para 2,5 mL de solução (p/v) e armazenados a -20 °C. Essas amostras foram posteriormente usadas para a extração de RNA total (para análise relativa de expressão gênica) e DNA genômico (para quantificação absoluta de bactérias), conforme descrito nas **Seções 3.2.6 e 3.2.7**. Adicionalmente, amostras de hepatopâncreas de cinco animais por condição foram individualmente coletadas, lavadas com tampão de Tris-salina e armazenadas a -80 °C para análises posteriores de atividade antioxidante e peroxidação lipídica.

### 1.1.20 Capacidade antioxidante e danos lipídicos no hepatopâncreas

As análises incluíram as atividades enzimáticas da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona-S-transferase (GST), bem como os níveis de glutathiona reduzida (GSH), grupos sulfidril proteicos (P-SH) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Brevemente, amostras de hepatopâncreas foram homogeneizadas em tampão de lise (0,5 M sacarose, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-Base, 0,15 M KCl, 1 mM DTT e 0,05 mM PMSF, pH 7,6), centrifugadas (10.000 ×g, 20 minutos, 4 °C) e mantidas em -20°C até as análises. Para amostras destinadas à avaliação de GSH, a homogeneização foi realizada sem a adição de DTT.

A concentração total de proteína foi determinada usando o método Biuret (Bioclin®). A atividade da CAT baseou-se na decomposição de 50 mM de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), com quantificação a 240 nm de Beutler (1975). Os resultados foram expressos como unidades de CAT, correspondentes à hidrólise de 1 μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto por mg de proteína a 25 °C, pH 8,0. A atividade da SOD foi avaliada medindo a redução do citocromo C, seguindo o método descrito por McCord e Fridovich (1998). Os resultados foram expressos em unidades SOD, onde uma unidade corresponde à quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do citocromo C por minuto por mg de proteína a 25 °C, pH 7,8. A atividade do GST foi determinada pela conjugação do GSH (1 mM) com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (1 mM CDNB), com a formação do complexo GSH-CDNB monitorada por absorção (λ = 340 nm; Leitor de microplacas ELx800, BioTek™), segundo Habig e Jakoby (1981) e expresso em nmol de CDNB conjugado por minuto por mg de proteína.

Os níveis de GSH e P-SH foram medidos a partir de amostras (2 mg/mL) precipitadas com 50% de ácido tricloroacético (TCA), seguidos pela centrifugação a 20.000 ×g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi usado para medir os níveis de GSH, e o pellet foi usado para quantificar P-SH, de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). A peroxidação lipídica no hepatopâncreas foi avaliada medindo substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), seguindo o método descrito por Oakes e Kraak (2003). O cromógeno formado foi quantificado por fluorimetria (Victor 2, Perkin Elmer™) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 515 e 550 nm, respectivamente. Tetrametoxipropano (TMP, Sigma-Aldrich™) foi usado como padrão. Dados relacionados a análises antioxidantes e danos lipídicos foram analisados usando o teste t-Student não pareado.

### 1.1.21 Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA

O RNA total e o DNA genômico (gDNA) do intestino médio foram extraídos usando o Mini Kit de DNA/RNA AllPrep (QIAGEN™), seguindo as instruções do fabricante. A quantificação e a qualidade do gDNA e RNA foram avaliadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose de 0,8%, respectivamente. A síntese complementar de DNA (cDNA) foi realizada após desnaturação térmica (70 °C por 5 minutos), utilizando 2,5 µg de RNA total em um volume de reação de 20 µL com o kit SuperScript® IV Reverse Transcriptase (Invitrogen™), mistura de dNTP de 0,5 mM (Sinapse), inibidor de RNase RiboLock™ 20 U/µL (Thermo Fisher Scientific™) e primers oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Bioline) de 2,5 µM. cDNA foi usado para expressão gênica do hospedeiro (**Seção 3.2.7**), enquanto o gDNA foi usado para quantificação bacteriana (**Seção 3.2.8**).

### 1.1.22 PCR quantitativa em tempo real por transcrição reversa baseada em fluorescência

Amplificações RT-qPCR foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific) em um volume final de 15 µL contendo 2 µL de cDNA (diluído 1:50), 0,2 µM de cada primer (**Tabela S1**) e 7,5 µL de PowerUp SYBR Green Master Mix 2× (Thermo Fisher Scientific). Os ensaios RT-qPCR foram submetidos a uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e recozimento/extensão a 60 °C por 1 minuto. Valores médios de quatro genes de referência (*LvEF1α*, *LvActin*, *LvRpS6* e *LvRpS3A*) foram usados para normalização de dados *RT-qPCR* e expressão relativa dos genes-alvo usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  (LIVAK e SCHMITTGEN 2001). Os níveis relativos de expressão dos genes-alvo (grupo A8) foram calibrados com o perfil de expressão do intestino médio de camarões alimentados com a dieta basal (grupo controle). Todos os ensaios eram realizados em duplicata. Diferenças na expressão gênica foram consideradas estatisticamente significativas em  $p < 0,05$  (corte para a mudança de duas vezes nos níveis de expressão) usando um teste t de Student não pareado. O mapa de calor foi gerado usando o software ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis>) (METSALU e VILO 2015).

### 1.1.23 Quantificação absoluta de alguns grupos bacterianos no intestino médio

Ensaio para a quantificação absoluta de alguns grandes grupos bacterianos comumente encontrados no intestino médio de *P. vannamei* foram realizados usando PCR quantitativa (qPCR), utilizando primers específicos para regiões conservadas do gene 16S rRNA. Os grupos-alvo incluíram a classe Gammaproteobacteria, os filos Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes, além do gênero *Vibrio* spp. (BACCHETTI DE GREGORIS et al., 2011; González et al., 2020). A escolha dos grupos bacterianos foi baseada em relatos anteriores que indicavam seu aumento da prevalência no intestino de camarões peneídeos (HOLT et al., 2021). As amplificações qPCR foram realizadas em triplicata usando um volume final de 15 µL contendo 1 µL de DNA genômico (100 ng/µL), 0,2 µM de cada primer e 7,5 µL do PowerUp SYBR Green Master Mix 2× (Thermo Fisher Scientific), sob as condições de amplificação descritas anteriormente. As contagens bacterianas no intestino médio do camarão foram calculadas usando uma curva padrão derivada de uma série de diluição de 10 vezes de um plasmídeo contendo a sequência alvo de DNA ( $10^8$  a  $10^2$  plasmídeos/µL;  $R^2 = 0.994$ ). Diferenças na quantificação absoluta das bactérias foram consideradas estatisticamente significativas em  $p \leq 0,05$  usando o teste t -Student não pareado.

## RESULTADOS

### 1.1.24 Parâmetros de qualidade da água

Em ambos os experimentos, a qualidade da água foi monitorada durante todo o período experimental até a coleta de tecidos. Os parâmetros avaliados permaneceram dentro da faixa ideal necessária ao bem-estar fisiológico dos animais e não houve registro de mortalidade. (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Parâmetros físico-químicos da qualidade da água de *juvenis de P. vannamei* alimentados com dieta basal (C) ou 8% de farelo de açaí (A8) em sistema RAS.

|                                 |                                        | Dietas     |            |
|---------------------------------|----------------------------------------|------------|------------|
|                                 |                                        | C          | A8         |
| Parâmetros de qualidade da água | Amônia total N-N <sub>3</sub> (mg/L)   | 0,2 ± 0,3  | 0,2 ± 0,3  |
|                                 | Nitrito N-NO <sub>2</sub> (mg/L)       | 2,2 ± 0,9  | 2,2 ± 0,9  |
|                                 | Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> /L) | 171 ± 18,1 | 171 ± 18,1 |
|                                 | Salinidade (g/L)                       | 35 ± 0,2   | 35 ± 0,2   |
|                                 | Temperatura (°C)                       | 28 ± 0     | 28 ± 0     |
|                                 | pH                                     | 8 ± 0,2    | 8 ± 0,2    |

### 1.1.25 A dieta A8 proporcionou um efeito antioxidante no hepatopâncreas

A suplementação dietética com A8 esteve associada a um aumento significativo nos níveis da enzima antioxidante catalase (CAT: 2,2×) (**Fig. 7**). Além disso, esses animais apresentaram níveis 29% menores do indicador de peroxidação lipídica TBARS em comparação com aqueles que receberam a dieta controle. Por outro lado, a atividade de outras moléculas avaliadas não se alterou em função da suplementação alimentar com A8.

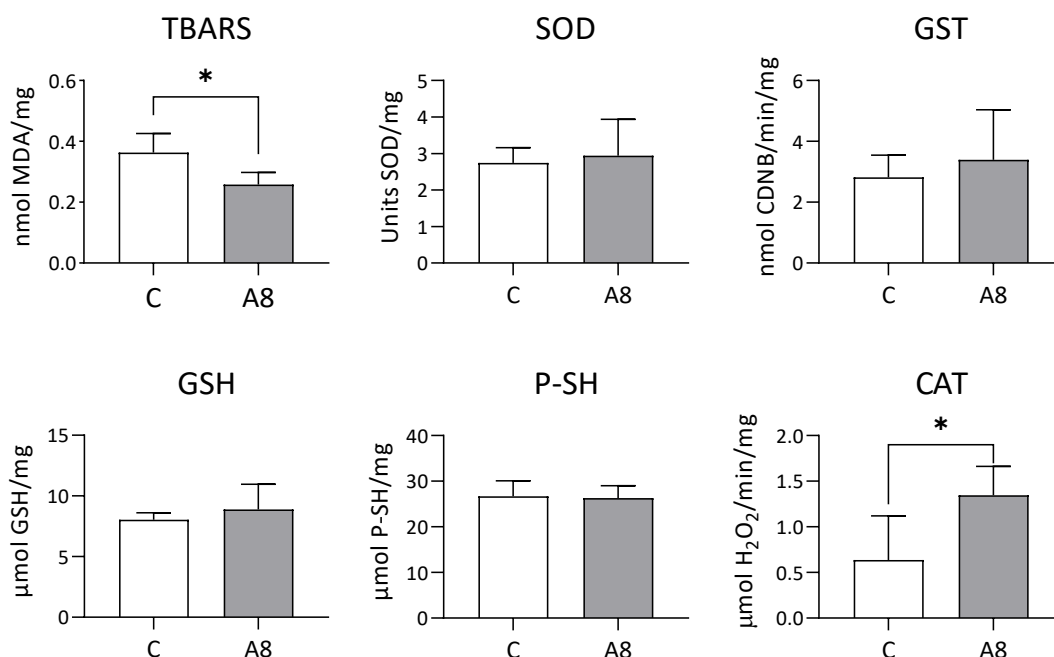


**Figura 7.** Comparação dos parâmetros de capacidade antioxidante e dano lipídico do hepatopâncreas entre camarões alimentados com dieta basal (C) ou com adição de 8% de farelo de açaí (A8). As análises incluíram níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e grupos sulfidríla totais (P-SH), além da atividade enzimática da glutatona-S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona reduzida (GSH). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. (\*) diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).

#### 1.1.26 A dieta A8 modulou alguns genes relacionados ao sistema imune

O perfil transcricional no intestino médio de camarões alimentados com dieta suplementada (A8) foi alterado em quatro dos 42 genes avaliados. O gene DUOX1, que produz espécies reativas de oxigênio no intestino (ROS) e possui ação microbicida, foi amplamente impactado, tendo sua expressão diminuída em 4x quando comparado àquela dos animais controle, recebendo a dieta basal. Como previsto, uma variação nos níveis de expressão foi encontrada entre o grupo controle e o experimental, indicando o grande polimorfismo genético associado ao sistema imune dos invertebrados. Contrariamente, três genes tiveram sua expressão aumentada com a dieta A8: Pelle (1,57x) associado à transdução de sinal da via Toll, STING (1,67 x) participa do reconhecimento de DNA viral e ativação antiviral via *interferon-like* e o gene GPx (1,6 x; glutatona peroxidase) associado à atividade antioxidante (**Fig. 8A**). Para os outros genes analisados, incluindo aqueles relacionados à resposta imunológica, sistema antioxidante, reconhecimento de padrões e vias antivirais, não

foram observadas diferenças estatisticamente significativas, apesar das aparentes variações nos valores médios de expressão (Fig. 8B).

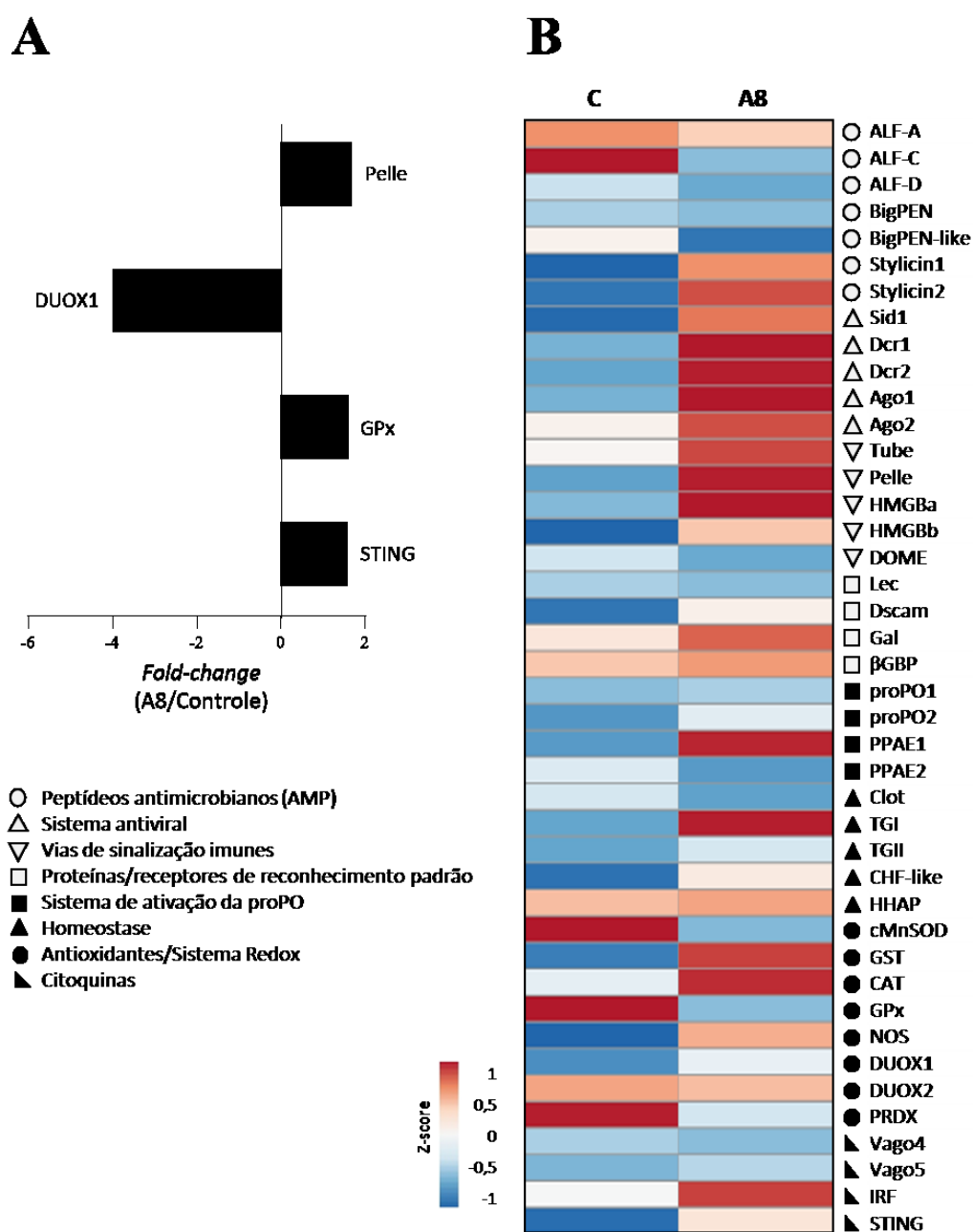


**Figure 8.** A: Expressão diferencial de genes que mostram alterações transcricionais estatisticamente significativas ( $\geq$  mudança 1,5 vezes; teste t-Student não pareado,  $p \leq 0,05$ ) entre os grupos A8 e controle (C). Os níveis de expressão relativa (A8/Controle) foram calibrados para a expressão gênica no MG de camarão alimentado com a dieta controle. Categorias funcionais de genes são indicadas por símbolos ao lado de cada nome de gene. B: Mapa de calor apresentando o perfil de expressão de 42 genes relacionados ao sistema imunológico no intestino médio de *P. vannamei* alimentado por 20 dias com uma dieta sem suplementação (C) ou com adição de 8% de farelo de açaí (A8). Cada célula na matriz representa a média de três conjuntos de níveis de expressão de um gene específico para uma condição experimental. A intensidade da cor (do azul ao vermelho) indica a magnitude da expressão, com base na escala de cores no canto inferior direito do mapa de calor.

### 1.1.27 A dieta A8 não alterou a comunidade bacteriana no intestino médio

A suplementação dietética com A8 não promoveu variações significativas no número absoluto de cópias do gene 16S rRNA ou na composição dos grupos bacterianos avaliados (**Fig. 9A**). Em termos de abundância relativa, a classe Gammaproteobactérias foi a mais abundante em ambos os grupos (C: 47,1 % e A8 45,6 %), seguida pelos filos Bacteroidetes (C: 26,7 % e A8 36,6 %), Actinobactérias (C: 19,7 % e A8 15,6 %) e Firmicutes (C: 6,4 % e A8 2,1 %) (**Fig. 9B**).

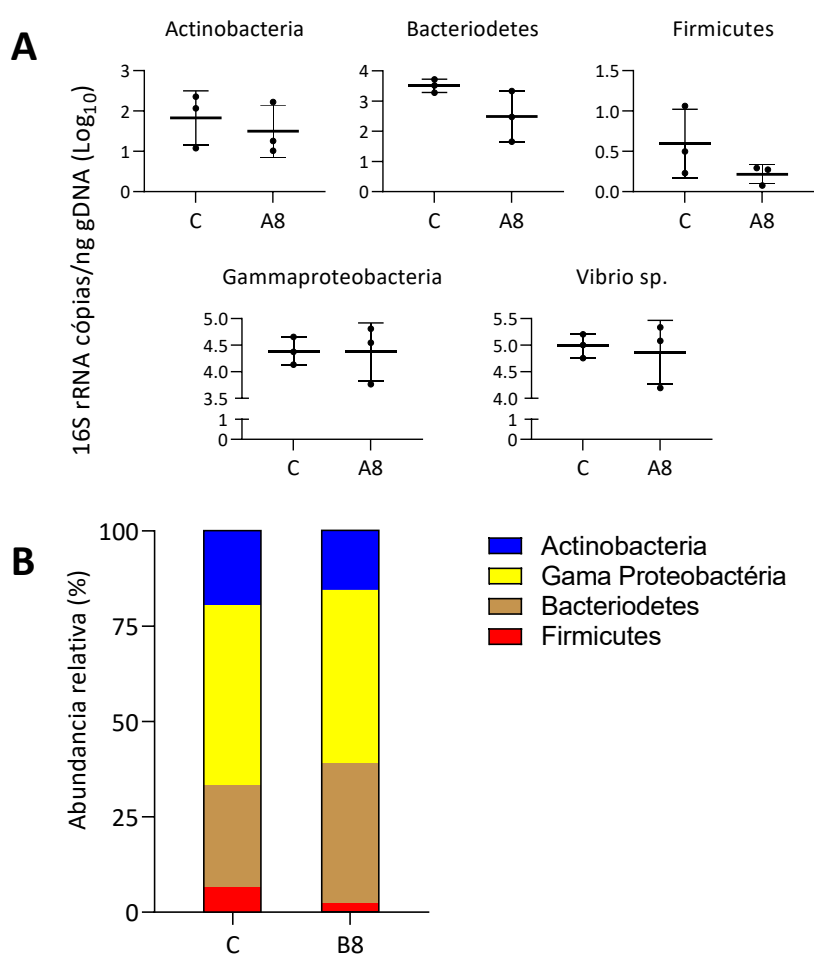


**Figure 97.** A: Quantificação absoluta de alguns dos grupos bacterianos mais abundantes no intestino médio de *P. vannamei* alimentado por 20 dias com uma dieta sem suplementação (C) ou com suplementação de 8% de farinha de açai (A8). Os valores são expressos em uma escala de Log<sub>10</sub> como cópias do gene 16S rRNA por ng de gDNA. Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão. B: Porcentagem da abundância relativa dos filos Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes, e da classe Gammaproteobactéria no intestino médio dos camarões. Os valores percentuais referem-se ao número de cópias Log<sub>10</sub> do gene 16S rRNA por ng de gDNA para cada grupo.

### 1.1.28 A dieta não alterou a sobrevivência frente ao WSSV

Apesar da modulação parcial do eixo imune–redox nos camarões suplementados, a dieta A8 não se traduziu em maior sobrevivência frente ao desafio com WSSV. A taxa de sobrevivência ao final do experimento foi idêntica ao do grupo controle (33%), indicando ausência de efeito imunoprotetor de A8 nas condições experimentais adotadas. Em ambos os tratamentos, a mortalidade foi elevada (67%) e teve início aproximadamente 72 h após a infecção sistêmica com a dose subletal de WSSV (DL<sub>50/15</sub>) (**Fig. 10**).

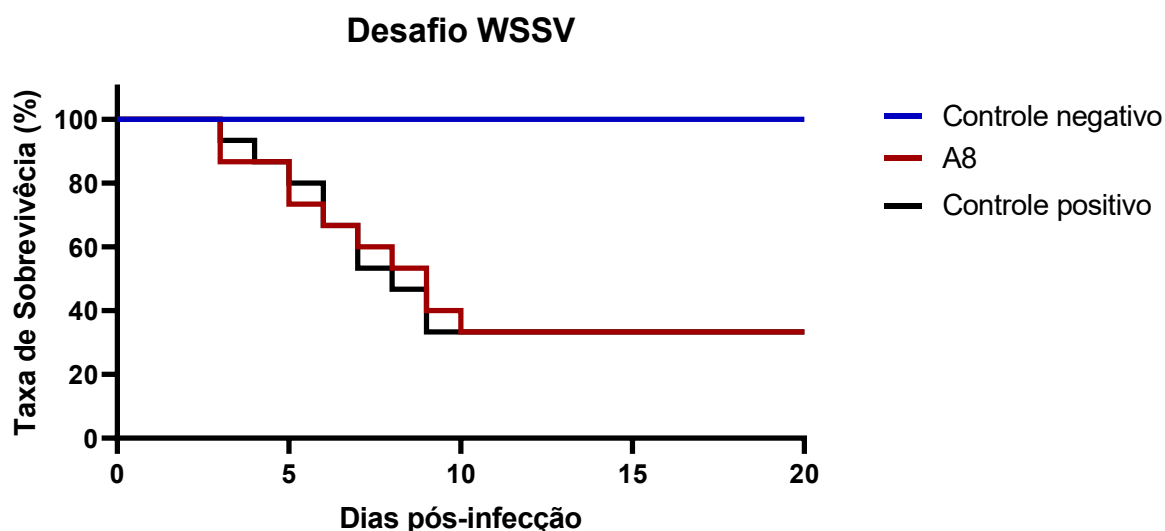


**Figura 10.** Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de camarões após infecção por WSSV.

## DISCUSSÃO

O uso de medidas profiláticas voltadas à prevenção de doenças na carcinicultura é amplamente desejável e recomendado. Nesse contexto, substâncias com potencial imunestimulante representam uma alternativa promissora para o reforço do sistema imune dos animais, especialmente quando administradas por meio da suplementação dietética com compostos naturais de origem vegetal (KULKARNI et al. 2021; GHOSH et al., 2021). Entre essas estratégias, destaca-se o uso de subprodutos vegetais ricos em compostos bioativos, como polifenóis, flavonoides e fibras funcionais, com potencial de modular respostas antioxidantes e parâmetros imunológicos em organismos cultiváveis (GHOSH et al., 2023). Nesse sentido, a

escolha do farelo avaliado neste estudo fundamenta-se na utilização de um subproduto agroindustrial de baixo custo, frequentemente considerado resíduo, mas que ainda apresenta relevante valor nutricional e elevada concentração de compostos bioativos. Essa abordagem se insere na busca por alternativas sustentáveis para o desenvolvimento de alimentos funcionais, com potencial de melhorar a imunidade de camarões cultivados e contribuir para o aumento da resistência frente a condições de estresse biótico e abiótico. A exposição a condições de estresse mediadas por fatores bióticos e abióticos distintos pode levar ao desequilíbrio do sistema imune do hospedeiro, tornando-o mais suscetível a enfermidades. Assim, a manutenção do equilíbrio do sistema de produção, aliada a boas práticas de manejo, qualidade da água, nutrição adequada e bem-estar animal, é fundamental para a sustentabilidade da atividade.

No presente estudo, foram avaliadas as condições de imunocompetência de juvenis de *P. vannamei* alimentados com dietas suplementadas com ingrediente vegetal proveniente do bioma Amazônico (farelo de açaí). Essa avaliação teve duração de 50 dias, por meio de análises bioquímicas, moleculares e da taxa de sobrevivência a um desafio sistêmico com WSSV (LD<sub>50/15</sub>).

Os nossos resultados sugerem que a suplementação dietética de camarões juvenis com farelo de açaí a 8% exerceu um efeito seletivo sobre a ativação do sistema de defesa antioxidante (SDA) no hepatopâncreas de *P. vannamei*. As alterações significativas na atividade de catalase (CAT;  $p > 0.05$ ) indicam que essa suplementação modificou de forma marcante a defesa antioxidante enzimática. Essas enzimas estão diretamente envolvidas na neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS) e na detoxificação de peróxidos lipídicos pela glutathione peroxidase (GPx) (REGOLI e GIULIANI 2014; SACHDEV et al. 2021). Esses achados indicam que a suplementação com A8 poderia modular alguns componentes associados ao estresse oxidativo no hepatopâncreas ou ainda promover mudanças detectáveis na atividade da CAT.

A produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) ocorre durante processos fisiológicos básicos, como a respiração celular e, em condições normais, essas moléculas atuam como importantes reguladores fisiológicos de vias de sinalização intracelular (FINKEL, 2011). Em situações de estresse, contudo, a produção de ROS é intensificada, podendo levar ao acúmulo excessivo dessas espécies e resultar em dano oxidativo a macromoléculas, como DNA,

proteínas e lipídios de membrana. Esse efeito é equilibrado pela atuação de um sistema de defesa antioxidante, composto por um conjunto complexo de moléculas capazes de interceptar ou degradar ROS, bem como participar da reparação dos danos decorrentes de seu aumento (SACHDEV et al. 2021).

A redução da peroxidação lipídica, mensurada pelo ensaio de TBARS, em conjunto com o aumento dos níveis de atividade da CAT, sugere que a modulação do SDA foi suficiente para atenuar o dano lipídico no hepatopâncreas de *P. vannamei*. A estabilidade nos níveis de grupos tióis de proteínas (P-SH) e de glutathiona reduzida (GSH) também indicam que a suplementação com A8 não promoveu indução de estresse oxidativo, ao invés, mantendo a estabilidade redox no hepatopâncreas. A manutenção de níveis estáveis de P-SH pode refletir um processo de adaptação do organismo, no qual as defesas antioxidantes preservam moléculas essenciais, ao mesmo tempo em que contribuem para o controle da peroxidação lipídica e para a manutenção de antioxidantes como a GSH, ajudando a proteger as células contra danos oxidativos excessivos (DAS e ROYCHOUDHURY 2014; TASTAN e SALEM 2021).

Em *P. vannamei*, STING é uma proteína adaptadora envolvida na detecção de ácidos nucleicos virais. A ativação de STING desencadeia cascatas de sinalização do tipo interferon-like, levando à produção de citocinas antivirais e à indução de genes efetores, como o Vago, que contribuem para a contenção da infecção viral. O gene DUOX1 (Duol Oxidase 1), que codifica uma enzima da família das NADPH oxidases, cuja função é a produção de ROS, especialmente peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (FINKEL, 2021) apresentou uma redução significativa em sua expressão (4 x) no grupo suplementado com A8, sugerindo haver um controle das vias pró-oxidativas mediadas por essa NADPH oxidase (CHEN et al. 2018). Essa diminuição pode ser interpretada como um mecanismo adaptativo, compatível com uma menor necessidade de produção endógena de ROS, uma vez que o perfil antioxidante dos camarões pode ter sido otimizado pela suplementação dietética com farelo de açaí.

Essa hipótese corrobora o aumento (2,2 x) na atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) e concomitante redução nos níveis de TBARS (29%), um indicador bioquímico de peroxidação lipídica. Esse cenário reforça a ideia de que a suplementação com compostos bioativos presentes no farelo de açaí pode atuar de forma preventiva, promovendo um ajuste metabólico que favorece a proteção contra o estresse oxidativo, sem comprometer a homeostase ou desencadear respostas

inflamatórias exacerbadas (FINKEL, 2011). Da mesma forma, o aumento discreto na expressão da enzima GPx (glutathione peroxidase) no intestino médio dos camarões alimentados com a dieta A8 indica que o farelo de açaí atuou como modulador relevante do eixo redox, sugerindo reforço da capacidade de detoxificação de peróxidos e de contenção do dano oxidativo em nível de mucosa intestinal. Em *P. vannamei*, diferentes isoformas de GPx têm sido caracterizadas como elementos-chave da defesa antioxidante, com transcritos e atividade enzimática responsivos a estressores ambientais e a desafios infecciosos, incluindo infecções por *Vibrio alginolyticus* e pelo próprio WSSV (LIU et al., 2007; PARRILLA-TAYLOR et al., 2013; FAN et al., 2022). Esses trabalhos em conjunto mostram que a indução de GPx acompanha o aumento de ROS e que a inibição/ redução de atividade se associa a um maior dano oxidativo. Isto pode ser acompanhado a uma maior mortalidade após infecções virais ou bacterianas, reforçando o papel funcional do produto gênico na interface entre estresse oxidativo e resistência a patógenos.

A suplementação com farelo de açaí (A8) resultou em aumento moderado da expressão dos genes STING, Pelle, CAT e GPx, acompanhado da repressão do gene DUOX1, delineando um eixo antiviral-antioxidante ativado de forma mais discreta. Quando comparados aos resultados previamente descritos para o farelo de buriti a 8%, que promoveram uma resposta mais robusta envolvendo STING, Vago4/5, TGII, CAT, PPAE1 e 2, associada a maior sobrevivência frente ao WSSV (REBOUÇAS et al., 2025), os dados de A8 sugerem a ativação de genes de defesa, porém com menor intensidade e sem repercussão clara em termos de sobrevivência sob a dose letal utilizada. Em conjunto, esses achados indicam que o açaí atua como modulador tônico da via Toll/STING e do metabolismo redox, enquanto o buriti exerce um efeito mais amplo e integrado sobre cascatas de coagulação, pró-fenoloxidase e vias antivirais, o que pode explicar a diferença no desfecho de mortalidade entre os dois ingredientes.

Outro gene, Pelle, teve sua expressão discretamente aumentada (1,57x) em função da suplementação alimentar com A8, indicando uma possível ativação da via Toll no intestino médio. Em artrópodes, Pelle é uma quinase serina/treonina e componente central da via de sinalização Toll, desempenhando assim papel essencial na imunidade inata (LI et al., 2013). Na cascata de sinalização do receptor Toll, promove a fosforilação dos adaptadores que levam à ativação de fatores NF- $\kappa$ B-like, como Dorsal e Relish, culminando na transcrição de AMPs e componentes da cascata de melanização (WANG et al., 2018). Em *P. vannamei*, a via Toll participa na resposta

contra infecção por bactérias Gram-positivas e, em determinados casos, também é recrutada frente a infecções por Gram-negativas e vírus, pela ativação sinérgica de componentes como o sistema proPO, lectinas e PAMs (LI et al., 2020).

Em *P. vannamei*, o gene STING codifica para uma citocina que participa do reconhecimento de DNAs dupla fita virais e, na via interferon-like (IFN-like), induz a produção efetores antivirais que atuam na replicação dos vírus (Li et al., 2015). Um estudo recente demonstrou que, *in vivo*, o STING de *P. vannamei* detecta diretamente os dsDNA virais, promove a dimerização e a translocação nuclear do fator regulador do IFN, induz a expressão de uma citocina análoga funcional do IFN (Vago4) e, por fim, estabelece um estado antiviral no camarão (Li et al., 2015). A inibição dessa via tem sido associada a maior susceptibilidade dos camarões a diferentes patógenos (LI et al., 2015). Nesse contexto, a regulação positiva do gene STING observada no grupo A8 é consistente com a hipótese de que a presença contínua de compostos bioativos do açaí na dieta deva ter promovido um estado de *priming antiviral*, favorecendo maior prontidão basal dessa via, mas que não foi suficiente para frear a infecção viral. O aumento dos transcritos STING ocorre em paralelo à elevação de genes antioxidantes (CAT, GPx) e à repressão do gene DUOX1, configurando um padrão compatível com um acoplamento funcional entre sensoriamento antiviral e resposta ao estresse oxidativo no intestino médio, ainda que essa relação causal permaneça, neste momento, como hipótese derivada do perfil de expressão observado.

No desafio viral, não foram observadas diferenças na sobrevivência entre os animais infectados alimentados com ração suplementada com 8% de farelo de açaí (A8) e aqueles alimentados com ração não suplementada. A elevada taxa de mortalidade observada nos animais controle (aproximadamente 77%) indica que a dose de WSSV utilizada foi muito severa, o que possivelmente mascarou diferenças sutis de sobrevivência entre o grupo controle e o suplementado, tais diferenças que poderiam se tornar mais evidentes com desafios menos agressivos. Nesse sentido, doses menos letais, como LD20/15 e LD30/15, poderiam possibilitar a detecção de efeitos mais sutis sobre a sobrevivência. Esse foi o caso de estudos anteriores conduzidos com doses menos letais. Cantelli e colaboradores (2019) infectou camarões com inóculo de WSSV capaz de matar 30% em 15 dias (DL<sub>50/15</sub>) e houve uma taxa de sobrevivência 11% maior após 32 dias de suplementação alimentar com polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria birdiae*. De forma semelhante, Pilotto et al. (2019) desafiaram os animais com  $3 \times 10^2$  partículas de WSSV

(correspondente a LD30/15) e observaram aumento significativo de 10% na taxa de sobrevivência dos camarões suplementados com dietas acrescidas de extratos secos de cianobactéria. Ademais, seria interessante se investigar em estudos futuros os possíveis efeitos antibacterianos do farelo vegetal empregado, considerando a hipótese de que os ingredientes possam conferir proteção contra infecções bacterianas. Ensaio de desafio com bactérias poderiam contribuir para a validação dessa hipótese e para a ampliação do entendimento sobre o potencial funcional dessa dieta.

A modulação positiva de genes associados à defesa antiviral via *interferon-like* STING, Vago 4 e Vago 5, coincidiu com maior sobrevivência dos camarões frente a desafio com o WSSV indicando que o farelo de açaí 8% deva exercer uma modulação antiviral mais discreta e potencialmente dependente de ajustes no estado imune-redox celular.

Por fim, a estabilidade da microbiota intestinal indica que a dieta A8 não promoveu alterações significativas nesse sistema. Assim, as respostas observadas em parâmetros imunológicos e antioxidantes refletem predominantemente ajustes fisiológicos do hospedeiro, em um contexto de eubiose. Embora alterações na microbiota possam estar associadas à sobrevivência, os resultados indicam que os benefícios observados ocorreram mesmo sem mudanças detectáveis na estrutura da comunidade bacteriana, sugerindo que a resposta foi predominantemente mediada por mecanismos fisiológicos do hospedeiro. Por outro lado, a predominância de uma microbiota bacteriana equilibrada é compatível com a hipótese de que as respostas imunes, antioxidantes e transcricionais observadas estejam associadas a uma interação simbiótica favorável, potencialmente mediada pelos compostos bioativos do farelo de açaí. Adicionalmente, a manutenção da eubiose intestinal sugere que o suplemento não impôs custo metabólico significativo aos animais e que a ausência de efeitos adversos para as bactérias residentes, reforça a segurança da dieta A8 na manutenção de um ambiente intestinal saudável e homeostático para os camarões.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, embora a suplementação dietética com 8% de farelo de açaí não tenha melhorado a sobrevivência dos camarões após um desafio sistêmico com WSSV com dose letal mediana, evidências moleculares e bioquímicas indicam que essa dieta modulou significativamente o equilíbrio imune–redox em *Penaeus vannamei*. Camarões alimentados com a dieta A8 apresentaram redução acentuada da peroxidação lipídica no hepatopâncreas, evidenciada por níveis mais baixos de TBARS, concomitantemente ao dobro de atividade de enzimas antioxidantes, catalase e glutathione peroxidase. Em contraste, a expressão de DUOX1 foi fortemente reduzida, sugerindo menor produção basal de espécies reativas de oxigênio. Em conjunto, esses achados indicam que a dieta suplementada com açaí promoveu um ambiente antioxidante citoprotetor, em vez de um estado antiviral potente, compatível com dietas ricas em compostos fenólicos e antioxidantes, como o açaí. A elevação moderada da expressão de Pelle e STING sugere um estado de alerta do sistema imune, porém sem a ativação completa dos mecanismos efetores antivirais. Esse perfil imune com equilíbrio redox pode ter favorecido a integridade tecidual e a estabilidade metabólica, mas aparenta ser insuficiente para conter a rápida replicação sistêmica do WSSV sob condições de desafio viral sistêmico e DL<sub>50/15</sub>.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-TAWWAB, M. The use of American ginseng (*Panax quinquefolium*) in practical diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): growth performance and challenge with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 24, p. 366–376, 2012.
- AL LAHAM, S. A.; AL FADEL, F. M. Antibacterial activity of various plant extracts against antibiotic-resistant *Aeromonas hydrophila*. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, p. 1–7, 2014.
- AMPARYUP, P. et al. Stimulator of interferon gene (STING) and interferon regulatory factor (IRF) are crucial for shrimp antiviral defense against WSSV infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 117, p. 240–247, 2021.
- Bacchetti De Gregoris, T.; Aldred, N.; Clare, A. S.; Burgess, J. G. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, p. 351–356, 2011.
- BATAGLION, J. M.; RAMAWAT, K. G. **Reference Series in Phytochemistry**. 2. ed. 2020.
- BEUTLER, E.; BEUTLER, B.; MATSUMOTO, F. Glutathione peroxidase activity of inorganic selenium and seleno-DL-cysteine. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 31, p. 769–770, 1975.
- BHUVANESWARI, R.; BALASUNDARAM, C. Anti-bacterial activity of *Acorus calamus* and some of its derivatives against fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, p. 205–211, 2012.
- BRIGGS, M.; FUNGE-SMITH, S.; SUBASINGHE, R.; MICHAEL, P. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. **FAO**, 2004.
- CANTELLI, L. et al. Dietary supplementation with sulfated polysaccharides from *Gracilaria birdiae* promotes delayed immunostimulation in marine shrimp challenged by WSSV. **Aquaculture International**, v. 27, p. 349–367, 2019.
- CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. Immune properties of invertebrate phenoloxidases. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 122, 104098, 2021.
- CHEN, Y. et al. Molecular characterization of the dual oxidase (LvDuox) gene from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Invertebrate Survival Journal**, v. 15, p. 316–326, 2018.
- COLOMBO, G. M. et al. The role of açai (*Euterpe oleracea*) as a chemoprotective agent in the evaluation of antioxidant defence, oxidative damage and histology of juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) exposed to ammonia. **Aquaculture Research**, v. 51, p. 1–16, 2020. DOI: 10.1111/are.14503.

DE GRUYSE, G. M. A et al. The shrimp nephrocomplex serves as a major portal of pathogen entry and is involved in the molting process. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 45, p. 28374-28383, 2020.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, v. 2, p. 53, 2014.

DE MOURA, L. B. et al. Dietary *Euterpe oleracea* essential oil as feed additive for ornamental fish. **Fishes**, v. 7, 2022. DOI: 10.3390/fishes7060369.

DEMBITSKY, V. M. et al. Nutritional properties of exotic fruits: biological activity and metabolites. **Food Research International**, v. 44, p. 1671–1701, 2011. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.03.003.

DO NASCIMENTO FERREIRA, J. et al. Assessing the impact of chemoautotrophic and heterotrophic biofloc cultivation systems on the immunity and intestinal bacteriome of shrimp. **Aquaculture International**, v. 32, p. 4647–4663, 2024. DOI: 10.1007/s10499-024-01394-7.

EMERENCIANO, M. G. C. et al. Intensification of penaeid shrimp culture: an applied review of advances in production systems, nutrition and breeding. **Animals**, v. 12, p. 236, 2022. DOI: 10.3390/ani12030236.

FAN, J. et al. A glutathione peroxidase gene from *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, 2022.

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **Journal of Cell Biology**, v. 194, p. 7–15, 2011. DOI: 10.1083/jcb.201102095.

FLEGEL, T. W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 166–173, 2012. DOI: 10.1016/j.jip.2012.03.004.

GOARANT, C. et al. “Summer Syndrome” in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. **Aquaculture**, v. 253, p. 105–113, 2006.

GONG, Y.; ZHANG, X. RNAi-based antiviral immunity of shrimp. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 115, 103907, 2021. DOI: 10.1016/j.dci.2020.103907.

GONZÁLEZ, R. et al. Hemocyte effectors shape scallop microbiota. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 599625, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.599625.

GORDON, A. et al. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleracea* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, p. 256–263, 2012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.150.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 398–405, 1981.

HANIFFA, M. A.; KAVITHA, K. Antibacterial activity of medicinal herbs against the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. **Culture**, v. 8, p. 205–211, 2012.

HOLT, C. C. et al. Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. Journal of invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 186, 107387, 2021. DOI: 10.1016/j.jip.2020.107387.

KAWATO, S. et al. Genome Sequence of *Vibrio nigripulchritudo* Strain TUMSAT-TG-2018, Isolated from Diseased Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Microbiology Resource Announcements**, v. 9, 2020.

KIBENG, F. S. Emerging viruses in aquaculture. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 97–103, 2019.

KONDO, H. et al. Draft genome sequence of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13. 17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. **Genome Announcements**, v. 3, p. 00978–15, 2015.

KOU, G.; PENG, S.; CHIU, Y.; LO, C. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. **Proceedings of the Special Session on Shrimp Biotechnology**, 1998.

KULKARNI, A. et al. Immune responses and protection in crustaceans. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, p. 431–459, 2021.

KUMAR, V. et al. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). **Toxins**, v. 13, p. 524, 2021.

LI, C. et al. Activation of Vago by IRF suggests IFN-like system in shrimp. **Scientific Reports**, v. 5, 15078, 2015.

LI, H. et al. TRAF3 restricts WSSV via IRF–Vago pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 2110, 2020.

LI, H. et al. Nucleic acid sensing by STING induces an IFN-like antiviral response in a marine invertebrate. **The Journal of Immunology**, v. 212, p. 1945–1957, 2024.

LI, X.-C. et al. Identification, characterization and functional analysis of Tube and Pelle homologs in the mud crab *Scylla paramamosain*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, e76728, 2013.

LIGHTNER, D. V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. Journal of invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 174–183, 2012.

LIU, S. et al. Hemocyte-mediated phagocytosis in crustaceans. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 268, 2020.

LIU, C. H.; TSENG M.C.; CHENG W. (2007) Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*,

and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 1, p. 34-45, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D.  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

MANSOUR, A. T. et al. Aquatic plants and animals in sustainability. **Sustainability**, v. 14, p. 3257, 2022.

MATOS, G. M. et al. Antimicrobial spectrum of activity and mechanism of action of linear alpha-helical peptides inspired by shrimp anti-lipopolysaccharide factors. **Biomolecules**, v. 13, p. 150, 2023.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). Journal of Biological chemistry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049–6055, 1969.

MELO, et al. Açai seeds: An unexplored agro-industrial residue as a potential source of lipids, fibers, and antioxidant phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 161, mar. 2021, 113204.

METSALU, T.; VILO, J. ClustVis: PCA visualization tool. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. W566–W570, 2015.

MORALES-COVARRUBIAS, M. S. et al. Shrimp bacterial infections in Latin America: A review. **Asian Fisheries Science**, v. 31, p. 76–87, 2019.

NERI-NUMA, I. A. et al. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, v. 103, p. 345–360, 2018.

NILE, S. H.; PARK, S. W. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. **Nutrition**, v. 30, p. 134–144, 2014.

NYA, E. J.; AUSTIN, B. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, v. 32, p. 963–970, 2009.

OAKES, K. D.; VAN DER KRAAK, G. J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 63, p. 447–463, 2003.

PAKRAVAN, S.; HAJIMORADLOO, A.; GHORBANI, R. Effect of dietary willow herb, *Epilobium hirsutum* extract on growth performance, body composition, haematological parameters and *Aeromonas hydrophila* challenge on common carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 861–869, 2012.

PARRILLA-TAYLOR, D. P.; ZENTENO-SAVÍN, T.; MAGALLÓN-BARAJAS, F. Antioxidant enzyme activity in pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to infection with white spot syndrome virus. **Aquaculture**, 2013.

PAUL, B. G.; VOGL, C. R. Impacts of shrimp farming in Bangladesh: Challenges and alternatives. **Ocean & Coastal Management**, v. 54, p. 201–211, 2011.

PERAZZOLO, L. M.; BARRACCO, M. A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 21, p. 385–395, 1997.

PILOTTO, M. R. et al. Potential immunomodulatory and protective effects of the *Arthrospira*-based dietary supplement on shrimp intestinal immune defenses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 88, p. 47–52, 2019.

REBOUÇAS J.S.A. et al. Amazonian buriti and pracaxi as potential functional feed additives to improve shrimp immunity and resistance to WSSV. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 167, 110703, 2025.

REGOLI, F, GIULIANI, M. E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine environmental research*, v. 93, p. 106–117, 2014.

SACHDEV, S. et al. Abiotic stress and ROS. **Antioxidants**, v. 10, p. 277, 2021.

SCHMITZ, M. J. et al. Modulation of nodularin toxicity in shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) fed with dietary açai (*Euterpe oleracea*) inclusion. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 103, p. 464–471, 2020.

SCHAUSS, A. G. Health benefits of açai. **Elsevier**, 2016.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192–204, 1968.

SILVEIRA, A. S. et al. An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 79, p. 44–50, 2018.

TASTAN, Y.; SALEM, M. O. A Use of phytochemicals as feed supplements in aquaculture: A review on their effects on growth, immune response, and antioxidant status of finfish. **Journal of Agricultural Production**, v. 2, p. 32–43, 2021.

THUONG, K. V. et al. Per os infectivity of white spot syndrome virus (WSSV) in white-legged shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and role of peritrophic membrane. **Veterinary Research**, v. 47, p. 39, 2016.

VERDEGEM, M. et al. The contribution of aquaculture systems to global production. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 54, p. 206–250, 2023.

WANG, P.-H. et al. The shrimp IKK–NF-κB signaling pathway regulates antimicrobial peptide expression and may be subverted by white spot syndrome virus to facilitate viral gene expression. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 10, p. 423–436, 2013.

VAN WYK, P.; SCARPA, J. Water quality requirements and management. Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. In: **Quality Assessment of Water and Wastewater**. 1999.

YU, Y. B. et al. Shrimp bacterial and parasitic diseases listed by OIE: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 166, 105545, 2022.

ZHOU, H. et al. *Aeromonas hydrophila*, an emerging causative agent of freshwater-farmed whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Microorganisms**, v. 7, p. 450, 2019.

## CONCLUSÃO GERAL

Em conjunto, os resultados apresentados nesta tese destacam-se pela abordagem experimental integrando análises imunológicas, bioquímicas e moleculares, bem como pela demonstração da eubiose intestinal dos animais e do potencial biotecnológico de co-produtos amazônicos avaliados, sob a perspectiva da economia circular e da bioeconomia marinha. Os ingredientes vegetais amazônicos utilizados (farelo de buriti e açaí) podem modular parcialmente a imunocompetência e o sistema redox de *P. vannamei* sem modificar a abundância dos principais grupos bacterianos predominantes no intestino médio, mantendo um quadro altamente desejável de eubiose. O farelo de buriti, em particular, destacou-se como o ingrediente de efeito mais consistente, promovendo um perfil hemato-imunológico mais robusto, um estado redox compatível com um padrão de hormose oxidativa no hepatopâncreas, além de uma melhora na sobrevivência dos animais frente ao desafio sistêmico com WSSV.

A hipótese de que os farelos amazônicos melhorariam o perfil hemato-imunológico e a sobrevivência frente ao WSSV foi claramente suportada pela dieta B8, demonstrada pelo aumento do número de hemócitos circulantes (THC), da atividade de fenoxidase, da concentração de proteínas totais do soro e da aglutinação de bactérias potencialmente patogênicas, acompanhado pela maior sobrevivência pós-desafio viral. Os farelos açaí e buriti na dieta ajustaram o balanço pró/antioxidante no hepatopâncreas, com aumento de atividade antioxidante e controle do dano oxidativo, evidenciando o potencial redox desses ingredientes.

Em relação à modulação de genes no intestino médio, o farelo de buriti 8% induziu um perfil transcricional compatível com uma maior resistência antiviral ao WSSV, ao qual foi reforçada pela alta sobrevivência dos animais frente ao desafio sistêmico com  $DL_{50/15}$ . Já, o farelo de açaí 8% exerceu um efeito mais moderado no sistema imune-redox, mas ainda assim coerente com um potencial estado de “alerta” imunológico. Já a suplementação com ambas as dietas indicou a manutenção de eubiose intestinal. Assim, o objetivo geral e a maior parte dos objetivos específicos foram alcançados, embora a definição de concentrações ótimas de inclusão e a avaliação sistemática do farelo de pracaxi permaneçam como pontos parcialmente abertos, já que se observou efeitos prejudiciais, como mortalidade, em concentrações de 4 e 8% de inclusão, sugerindo um efeito citotóxico para os camarões.

## Perspectivas Futuras

Como perspectivas futuras, torna-se pertinente aprofundar investigações sobre estratégias combinatórias de ingredientes funcionais, ajustes finos de dose, duração e janela fisiológica de suplementação, além da avaliação desses aditivos sob condições de infecção natural ou via *per os*, mais representativas dos sistemas de cultivo comerciais. Estudos futuros poderão testar dietas que combinem farelos de açaí e buriti, buscando formulações que conciliem desempenho zootécnico, imunoproteção e viabilidade econômica. Por fim, considera-se essencial validar essas dietas funcionais em condições de cultivo a campo, avaliando o desempenho zootécnico produtivo aliado à sanidade aquícola.

Outra linha promissora envolveria a caracterização da microbiota intestinal com maior resolução, por meio de abordagens como sequenciamento de 16S rRNA, metagenômica e metabolômica, capazes de revelar recursos biotecnológicos ou alterações sutis em níveis taxonômicos. Adicionalmente, estudos com abordagens funcionais baseadas em RNA de interferência, análises integrativas ômicas e modelagem de redes imune–metabólicas, seriam fundamentais para elucidar os limiares entre citoproteção redox e ativação antiviral efetiva, contribuindo para o desenvolvimento racional de dietas funcionais sustentáveis e cientificamente embasadas para a carcinicultura mais resiliente e sustentável, na qual a biodiversidade amazônica seja reconhecida como fonte estratégica de inovação em imunonutrição aplicada.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ASCHE, F. et al. The economics of shrimp disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 186, p. 107397, 2021.

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. **Guía Técnica: Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**, p. 169–224, 2014.

BOLÍVAR-RAMÍREZ, N. C. et al. Tannins as a food additive in pacific white shrimp diet. **Aquaculture**, v. 555, 738232, 2022. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2022.738232.

BRIGGS, M. Matthew et al. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. **Nucl. Phys.**, v. 10, n. 1, p. 92, 2004.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 131–134, 2005.

CANTELLI, L. et al. Dietary supplementation with sulfated polysaccharides from *Gracilaria birdiae* promotes a delayed immunostimulation in marine shrimp challenged by the white spot syndrome virus. **Aquaculture International**, v. 27, n. 2, p. 349–367, 2019.

DA COSTA, R. S. et al. Agro-Industrial By-Products from Amazonian Fruits: Use for Obtaining Bioproducts. **Bioactive Compounds in Nutraceutical and Functional Food for Good Human Health**. IntechOpen, 2021.

DE GREGORIS, T. B. et al. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 3, p. 351–356, 2011.

DE SOUZA SILVA, A. P. et al. Phenolic profile and the antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties of açai (*Euterpe oleracea*) meal: a prospective study. **Foods**, v. 12, n. 1, p. 86, 2023.

DO NASCIMENTO FERREIRA, J. et al. Assessing the impact of chemoautotrophic and heterotrophic biofloc cultivation systems on the immunity and intestinal bacteriome of shrimp. **Aquaculture International**, v. 32, p. 4647–4663, 2024.

DOS SANTOS COSTA, M. N. F. et al. Characterization of *Pentaclethra macroloba* oil: Thermal stability, gas chromatography and Rancimat. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2269–2275, 2014.

DOS SANTOS, P. P. et al. Development of lycopene-loaded lipid-core nanocapsules: physicochemical characterization and stability study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 2, 2015.

EKASARI, J. et al. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 332–339, 2014.

EMERENCIANO, M. G. C. et al. Intensification of Penaeid Shrimp Culture: An Applied Review of Advances in Production Systems, Nutrition and Breeding. **Animals**, v. 12, n. 3, 2022.

ESCOBEDO-BONILLA, C. M. et al. Pathogenesis of a Thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile *Litopenaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 74, p. 85–94, 2007.

ESCOBEDO-BONILLA, C. M. et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 1–18, 2008.

FAO. FAO Report: Global fisheries and aquaculture production reaches a new record high. Rome: **Food and Agriculture Organization** of the United Nations, 2024.

FARIAS, N. D. et al. *Litopenaeus vannamei* stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 86, p. 82–92, 2019.

FLEGEL, T. W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 166–173, 2012.

FLEGEL, T. W. A future vision for disease control in shrimp aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 2, p. 249–266, 2019.

GHOSH, A. K.; PANDA, S. K.; LUYTEN, W. Anti-vibrio and immune-enhancing activity of medicinal plants in shrimp: A comprehensive review. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 117, n. April, p. 192–210, 2021.

HOLT, C. C. et al. Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 186, 107387, 2021.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal 2024**. *Produção da Pecuária Municipal*, Rio de Janeiro, v. 52, p. 1–12, 2024.

KIM, S. K. et al. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 2, p. 362–371, 2014.

KONDO, H.; VAN, P. T.; DANG, L. T. Draft Genome Sequence of Non-*Vibrio parahaemolyticus* Acute Diseased Shrimp in Vietnam. **Genome announcements**, v. 3, n. 5, p. 2014–2015, 2015.

KOOLOTH VALAPPIL, R.; STENTIFORD, G. D.; BASS, D. The rise of the syndrome – sub-optimal growth disorders in farmed shrimp. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 1888–1906, 2021.

KOU, G. et al. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology, **National Center for Genetic Engineering and Biotechnology**, p. 267–271, 1998.

- KULKARNI, A. et al. Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 431–459, 2021.
- LIGHTNER, D. V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 174–183, 2012.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LIAO, X.; HE, J.; LI, C. Decapod iridescent virus 1: An emerging viral pathogen in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, 8 mar. 2022.
- LIU, F. et al. Antennal gland of shrimp as an entry for WSSV infection. **Aquaculture**, v. 530, 735932, 2021.
- LO, C. F. et al. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 25, n. 1–2, p. 133–141, 1996.
- LO, C. F.; KOU, G. H. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: A review. **Fish Pathology**, v. 33, n. 4, p. 365–371, 1998.
- MAQSOOD, S. et al. International Aquatic Research Emerging role of immunostimulants in combating the disease outbreak in aquaculture. **International Aquatic Research**, v. 3, p. 147–163, 2011.
- MATOS, G. M.; ROSA, R. D. On the silver jubilee of crustacean antimicrobial peptides. **Reviews in Aquaculture**, v. 14, n. 2, p. 594–612, 2021.
- MCGAW, I. J.; CURTIS, D. L. A review of gastric processing in decapod crustaceans. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 183, n. 4, p. 443–465, 2012.
- PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1199–1205, 2009.
- PEREIRA-FREIRE, J. A. et al. Nutritional, physicochemical and structural parameters of *Mauritia flexuosa* fruits and by-products for biotechnological exploration of sustainable goods. **Food technology and biotechnology**, v. 60, n. 2, p. 155–165, 2022.
- PILOTTO, M. R. et al. Exploring the impact of the biofloc rearing system and an oral wssv challenge on the intestinal bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, 2018.
- PILOTTO, M. R. et al. Potential immunomodulatory and protective effects of the Arthrospira-based dietary supplement on shrimp intestinal immune defenses. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 88, n. February, p. 47–52, 2019.

PILOTTO, M. R. et al. Environmental rearing conditions are key determinants of changes in immune gene expression patterns in shrimp midgut. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 106, n. January, p. 103618, 2020.

RAMOS-ESCUADERO, F. et al. Oil From Three Aguaje Morphotypes (*Mauritia flexuosa* L.f.) Extracted by Supercritical Fluid With CO<sub>2</sub>: Chemical Composition and Chromatic Properties. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, n. March, p. 1–14, 2022.

RODRIGUES, R. B. et al. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4162-4167, 2006. DOI: 10.1021/jf058169p

SANTIAGO, G. M. P. et al. Avaliação da atividade larvívica de saponinas triterpênicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Fresen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 187–190, 2005.

SCHAUSS, A. G. et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (açai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8598-8603, 2006.

SILVEIRA, A. S. et al. An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 79, p. 44–50, 2018.

SIMIÃO, C. DOS S. et al. Inclusion of Amazonian *Mauritia flexuosa* fruit pulp as functional feed in the diet for the juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 4, p. 1731–1742, 2020.

SIMMONS, C. V.; BANOVA, F.; BANOVA, D. Use of a topical anhydrous silicone base containing fatty acids from pracaxi oil in a patient with a diabetic ulcer. **SAGE Open Medical Case Reports**, v. 3, p. 2050313X1558967, 2015.

SMITH, V. J.; BROWN, J. H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: Does it really protect against infection? **Fish and Shellfish Immunology**, v. 15, n. 1, p. 71–90, 2003.

SODERHALL, K.; HALL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 797, n. 1, p. 99–104, jan. 1984.

SOONTHORNCHAI, W. et al. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 1, p. 19–28, 2010.

SOONTHORNCHAI, W. et al. Interaction of vibrio spp. with the inner surface of the digestive tract of *penaeus monodon*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–18, 2015.

TEIXEIRA, G. L. et al. Composition, thermal behavior and antioxidant activity of

pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) seed oil obtained by supercritical CO<sub>2</sub>. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, n. January, 2020.

TRAN, L. et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, n. 1, p. 45–55, 2013.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1–12, 2002.

VIEIRA, G. C. et al. Morphological and functional characterization of the hemocytes from the pearl oyster *Pteria hirundo* and their immune responses against *Vibrio* infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 70, p. 750–758, 1 nov. 2017.

XIONG, J. Progress in the gut microbiota in exploring shrimp disease pathogenesis and incidence. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 17, p. 7343–7350, 2018.

XIONG, J. B.; SHA, H. N.; CHEN, J. Updated roles of the gut microbiota in exploring shrimp etiology, polymicrobial pathogens, and disease incidence. **Zoological Research**, v. 45, n. 4, p. 910–923, 2024.

WU, J. L. et al. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 47, n. 2, p. 129–135, 2002.

ZENG, S. et al. Composition, diversity and function of intestinal microbiota in shrimp. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 7, p. 2783–2794, 2017.

ZENG, S. et al. The intestine microbiota of shrimp and its impact on cultivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2024.

ZHANG, M. et al. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed diets with different lipid sources. **Aquaculture**, v. 434, p. 449–455, 2014.

YAMAGUCHI, K. K. et al. Amazon acai: Chemistry and biological activities: A review. **Food chemistry**, v. 179, p. 137–151, 2015.

# APENDICES

## Apêndice A:

**Tabela S1.** Lista de todos os iniciadores (*primers*) utilizados ao longo da tese.

|                              | Gene Symbol   | Gene name                                                            | GenBank      | Primer-Fw (5'-3')        | Primer-Rv (5'-3')         | Primers Reference |
|------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------|---------------------------|-------------------|
| Reference                    | EF1- $\alpha$ | Elongation factor 1- $\alpha$                                        | GU136229     | TGGCTGTGAACAAGATGGACA    | TTGTAGCCACCTTCTTGACG      | 1                 |
|                              | Rps3A         | 53A ribosomal protein                                                | BF023924     | GGCTTCTATAGTGTGCTCC      | TCATGCTTGGCTCGCTG         | 1                 |
|                              | Actin         | $\beta$ -actin                                                       | AF300705     | CCACGAGACCACCTAGAAC      | AGCGAGGCAGTGAATTC         | 2                 |
|                              | RpS6          | 40S ribosomal protein S6                                             | FE080516     | AGCAGATACCCCTTGTTGAAG    | GATGCAACACCGGACTGAC       | 3                 |
| Antimicrobial peptides (AMP) | BigP1N        | Big penceidin 1                                                      | XM_027379151 | ACCACAGACCCCAAGTCTCTA    | AGTTCGGCAGATTTTCGGT       | This study        |
|                              | BigP1N-like   | Big penceidin 2                                                      | XM_027379154 | CCTGAAGATCTTCAAGGCTC     | AAGGATTAGGACGCTGAAG       | This study        |
|                              | ALF-A         | ALF Group A                                                          | EW713395     | CTGATTGCTCTTGTCACACG     | TGACCCATGAACCTCACCTC      | 4                 |
|                              | ALF-C         | ALF Group C                                                          | FE058235     | ATCGAGTGTCTGTCCTCAG      | TGAGTTTGTCCGCGTGGCC       | 4                 |
| Antimicrobial peptides (AMP) | ALF-D         | ALF Group D                                                          | FE069658     | TGCTAGTGAATCGAGTCC       | CGCTTCTCTCCGACAAATG       | 4                 |
|                              | Stylin1       | Stylin 1                                                             | MH108957     | CACAAGAGTGCCACCGGTG      | ACATTCGAGTTATGTTAGCC      | 3                 |
|                              | Stylin2       | Stylin 2                                                             | MH108958     | CACAAGAGTGCCACCGGTG      | CACACAGCTGCCGACATAA       | 3                 |
|                              | Tube          | Tube (IRAK4)                                                         | JN180645     | TGACAGATTCCAGTGGATCATGC  | CTTCCAAAGATGTGGCTTAACGTG  | 5                 |
| Immune signaling pathways    | Pelle         | Pelle (IRAK1)                                                        | KC346864     | GTTTATGGCTACTGGGACAGATCC | CATGTGAGAGCTTTTGTGGACTTC  | 5                 |
|                              | DOME          | JAK/STAT pathway receptor Domeless                                   | KC346866     | CTCAGGCTATGTTTCTCAGGATTC | CACGGCAGTTCCTTATGTTCT     | 6                 |
|                              | HMGBa         | High-mobility group                                                  | HQ228174     | GGATGAAGAGTCAAGTACG      | TCCTCGTCTCTCTCTCTC        | 3                 |
|                              | HMGBb         | High-mobility group (HMGBb)                                          | HQ228175     | GATGAAGGATACAGGGGAC      | ATCACCTACTCCCATGTCAG      | 3                 |
| Pattern proteins/receptors   | LCRP          | Lipopolysaccharide and $\beta$ -1,3-glycan binding protein           | EU102286     | AATCCAGCATCATAGTTATACC   | GTCATCGCTTCCAGTTG         | 8                 |
|                              | GaI           | Galectin                                                             | KF179103     | AATGCTTTCACAGGACAGC      | GTCTTCAATCCAGACACAGG      | 7                 |
|                              | Dcam          | Down syndrome cell adhesion molecule                                 | GQ154653     | AGGTGGACAAATCCGTGTG      | GGAGTATGTTGTGACTGTG       | 3                 |
|                              | Lec           | C-type lectin 4                                                      | EF583939     | ACAGGCTTTGTGCACACTTC     | TGCTCTGC CAAGTTAGGTG      | 8                 |
| RNA interference system      | Skl1          | Skl-1                                                                | HM234688     | GAAGCAATGGCAGTCTATGAAC   | TGGAACCTATCTCTGC AACTTG   | 9                 |
|                              | Ago1          | Argonaute 1                                                          | HM234689     | TGCGTCAATTGGCCATCCAT     | GCCATCTGGAGCGGAGAAG       | 9                 |
|                              | Ago2          | Argonaute 2                                                          | HM234690     | GATGGCATGAAGTCTGCAGTTG   | TGGCCAGCACCTCACTAAG       | 9                 |
|                              | Der1          | Dierr-1                                                              | EU676241     | CCGGAGATAGAAGCGTTCAGTG   | CGATAATCTCTCCCAACACCTG    | 10                |
| proPO activating system      | Der2          | Dierr-2                                                              | HQ541163     | AGGAAATGC AATGTCGTGGTT   | ACGAGCCCTCCCTAGATT        | 11                |
|                              | proPO1        | Prophenoloxidase 1                                                   | EU284136     | CGGTGACAAAGTTCCTCTTC     | GCAGTGCCTCGTAGTAAG        | 2                 |
|                              | proPO2        | Prophenoloxidase 2                                                   | EU284136     | CGGGAATGACTTTGGTCTCG     | AAGTGACGTCATCGGAGAGG      | 3                 |
|                              | PPAE1         | Prophenoloxidase-activating enzyme 1 (PPAE1)                         | EU284136     | CGGTGACAAAGTTCCTCTTC     | GCAGTGCCTCGTAGTAAG        | 3                 |
| Antioxidants                 | PPAE2         | Prophenoloxidase-activating enzyme 2                                 | FE090793     | TCAGCAGGATTTGTGTGTC      | GTCTCTGAAGCCCTCGAG        | 3                 |
|                              | GST           | Glutathione S-transferase (GST mu-class)                             | AY573381     | CACCTACGAACACTACGAAC     | GGTCTGAAGCCCTCGAG         | 3                 |
|                              | NOS           | Nitric oxide synthase (NOS)                                          | GQ429217     | GAGCAAGTTATTCGGCAAGGC    | TCCTCCCAAGTTCTTGGCGT      | 10                |
|                              | cMnSOD        | Cytosolic manganese superoxide dismutase (MnSOD)                     | AY486424     | TCATGCTTTGCCACCTCTC      | CCGCTCAACCAACTTCTTC       | 2                 |
| Antioxidants                 | CAT           | Catalase                                                             | AY518322     | CATCTTCATTCACACGACG      | CTTGATGCTTGTCTCCGTC       | 3                 |
|                              | GPx           | Glutathione peroxidase                                               | AY973252     | AGAGTTCGGGACAAAGCTG      | TCGGTAGTGTCTCTCTGGTG      | 3                 |
|                              | DUOX1         | Dual oxidase 1                                                       | MG734366     | GGTAC AAGTTCGAGTCCGCG    | TGTTGACATCTCTCCGCTCC      | 12                |
|                              | DUOX2         | Dual oxidase 2                                                       | HAAW01014722 | TCGCGCAATCTACATGAGCG     | ATGTTCTCTTGTCTGGCTGC      | 8                 |
| Homeostasis                  | PRDX          | Peroxisdioxin                                                        | GQ995702     | ACGGACAGTTC AAGGAGATC    | GAAATTCCTCAACACGGTACG     | 3                 |
|                              | Cblt          | Hemolymph clottable protein                                          | DQ984182     | ACCAAGGTCTCTCATTCAC      | TGTCCTCACTCCAGGGTGTCT     | 3                 |
|                              | TGI           | Transglutaminase I                                                   | EF081004     | GAGCTTCAAGATCGAGGATCGA   | GCTGGTGTCTGAGCGGTATATC    | 13                |
|                              | TGII          | Transglutaminase II                                                  | EU164849     | GCCTGAGGACAGGGAAA        | GCCTGTCTAGAGATATCCA       | 14                |
| Cytokines                    | HHAP          | Hemocyte homeostasis-associated protein (HHAP)                       | FE124306     | CAAGCAGGTCAAGCACAGAG     | CTTGAACCAACAAATAGAAGCC    | 3                 |
|                              | C-HF-like     | Crustacean hematopoietic factor-like protein (CHF)                   | K1641925     | GTGACAGCTTGACTTGTC       | AAATCTCTCTAGACCTTTGG      | This study        |
|                              | Vago4         | Single von Willebrand factor type C domain protein 4 (SVC4 or Vago4) | HQ541161     | AGCTGTGCCCCCATCATCT      | ATCCAAATCTGTGAACCTGTCTGTA | 11                |
|                              | Vago5         | Single von Willebrand factor type C domain protein 5 (SVC5 or Vago5) | HQ541162     | GAGGATTTGATGCTGCTGTG     | AAATGCCCTGCTCTTGTGTCG     | 11                |
| Cytokines                    | STING         | Stimulator of interferon gene                                        | KY490589     | CTCAGACACTCTGGGAGGC      | CCGTGCTGCTGTCTCGAAGG      | This study        |
|                              | IRF           | Interferon regulatory factor                                         | KM277954     | ACGCTGCCCTCTTTCGCTAC     | ACGCTGTGAACCTGAAGTATCG    | 15                |

## REFERÊNCIAS (TABELA SUPLEMENTAR 1):

1. DE LA VEGA, E. et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): a broad-spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 1916–1925, 2008.
2. WANG, Y. C.; CHANG, P.-S.; CHEN, H.-Y. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 1161–1177, 2007.
3. GONÇALVES, P. et al. Molecular signatures at imminent death: hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 42, p. 294–301, 2014.
4. ROSA, R. D. et al. Functional divergence in shrimp anti-lipopolysaccharide factors (ALFs): from recognition of cell wall components to antimicrobial activity. **PLOS ONE**, v. 8, e67937, 2013.
5. LI, C. et al. Presence of Tube isoforms in *Litopenaeus vannamei* suggests various regulatory patterns of signal transduction in invertebrate NF-κB pathway. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 42, n. 2, p. 174–185, 2014.
6. YAN, M. et al. Identification of a JAK/STAT pathway receptor domeless from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 44, p. 26–32, 2015.
7. SILVEIRA, A. S. et al. An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 79, p. 44–50, 2018.
8. DO NASCIMENTO, J. F. et al. Assessing the impact of chemoautotrophic and heterotrophic biofloc cultivation systems on the immunity and intestinal bacteriome of shrimp. **Aquaculture International**, 2024, p. 1–17.
9. LABREUCHE, Y. et al. Non-specific activation of antiviral immunity and induction of RNA interference may engage the same pathway in the Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, p. 1209–1218, 2010.
10. YAO, X. et al. A Dicer-1 gene from white shrimp *Litopenaeus vannamei*: expression pattern in the processes of immune response and larval development. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, p. 565–570, 2010.
11. CHEN, Y.-H. et al. Identification and functional characterization of Dicer2 and five single VWC domain proteins of *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, p. 661–671, 2011.

12. CHEN, Y. et al. Molecular characterization of the dual oxidase (LvDuox) gene from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Invertebrate Survival Journal**, v. 15, p. 316–326, 2018.
13. YEH, S. P. et al. Immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* after concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, p. 582–588, 2009.
14. YEH, M. S.; TSAI, W.-L.; CHENG, W. Identification and cloning of the second type transglutaminase from *Litopenaeus vannamei*, and its transcription following pathogen infection and in relation to haemolymph coagulation. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, p. 1613–1623, 2013.
15. PILOTTO, M. et al. Environmental rearing conditions are key determinants of changes in immune gene expression patterns in shrimp midgut. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 106, 103618, 2020.

## ANEXOS

## ANEXO 1. Folha de rosto do artigo 1, referente ao capítulo 2 da tese.

Fish and Shellfish Immunology 167 (2025) 110703



Contents lists available at ScienceDirect

## Fish and Shellfish Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fsi](http://www.elsevier.com/locate/fsi)

Full length article

## Amazonian buriti and pracaxi as potential functional feed additives to improve shrimp immunity and resistance to WSSV



José Stênio A. Rebouças<sup>a</sup>, Abdon O. Vieira<sup>a</sup>, Ediane M. Rubas<sup>a</sup>, Doris S.M. Souza<sup>a</sup>,  
 Franceli R. Kulcheski<sup>b</sup>, Larissa Müller<sup>c</sup>, Vitória D. de Oliveira<sup>d</sup>, Juliane Ventura Lima<sup>c</sup>,  
 Felipe W. Mendonça<sup>e</sup>, Rafael D. Rosa<sup>a</sup>, Luciane M. Perazzolo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Applied Immunology in Aquaculture, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88035-972, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Group of Plant Molecular Biology, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, 88035-972, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup> Institute of Biological Sciences, Federal University of Rio Grande, 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Nutrition of Aquatic Species, Department of Aquaculture, Federal University of Santa Catarina, 88035-972, Florianópolis, Brazil

<sup>e</sup> Prospera Nutrição & Consultoria LTDA, Avenida Campeche 2930, Unidade 203, 88063-301, Florianópolis, SC, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Mauritia flexuosa*  
*Pentaclethra macroloba*  
 Dietary supplementation  
 Intestinal immunity  
 Innate immune parameters  
 Transcriptional profile  
 Antiviral defense

## ABSTRACT

Environmental and nutritional factors are critical in modulating the immune system of *Penaeus vannamei*, particularly under viral threats such as white spot syndrome virus (WSSV). This study evaluated the effects of two Amazonian plant-based feed additives, buriti (*Mauritia flexuosa*) and pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) brans, on shrimp immunocompetence, oxidative balance, and resistance to WSSV. Shrimp were fed diets supplemented with 4 % or 8 % of each ingredient. The group receiving 8 % buriti (B8) exhibited the most consistent improvements in immunoparameters, including enhanced phenoloxidase activity, elevated serum protein concentration, and stronger agglutination responses against marine bacterial pathogens. In contrast, pracaxi-supplemented diets negatively affected shrimp performance and survival. Following WSSV challenge, shrimp fed the B8 diet showed a 25 % increase in survival compared to controls. Biochemical analyses revealed increased catalase activity, elevated reduced glutathione levels, and decreased lipid peroxidation, indicating enhanced antioxidant capacity and reduced oxidative stress in the hepatopancreas. Additionally, the expression of immune-related genes (PPAE1, PPAE2, TGH, CAT) and antiviral effectors (Vago4, Vago5, STING) was up-regulated, suggesting activation of antimicrobial, redox-sensitive and interferon-like antiviral pathways. No significant changes in midgut bacterial microbiota were observed, the dietary safety of the B8 formulation. These findings demonstrate that dietary inclusion of buriti bran at 8 % emerges as a natural feed additive that enhances WSSV resistance in *P. vannamei* by promoting immune resilience and oxidative homeostasis. Moreover, its sustainable production and alignment with circular economy principles and the Blue Amazon initiative underscore its potential as a functional feed additive for eco-friendly aquaculture.