

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

**EFEITO IMUNOESTIMULANTE DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS**  
**DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilaria caudata* NA REVERSÃO**  
**SEXUAL DE TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1766)**  
**EM CONDIÇÕES ADVERSAS.**

**GLACIO SOUZA ARAUJO**

**FORTALEZA – CEARÁ - BRASIL**

**AGOSTO/2006**

**EFEITO IMUNOESTIMULANTE DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS  
DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gracilaria caudata* NA REVERSÃO  
SEXUAL DE TILÁPIA DO NILO, *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1766)  
EM CONDIÇÕES ADVERSAS.**

**GLACIO SOUZA ARAUJO**

**Dissertação submetida à Coordenação do Curso  
de Pós-graduação em Engenharia de Pesca,  
como requisito parcial para a obtenção do grau  
de Mestre em Engenharia de Pesca.**

**FORTALEZA – CEARÁ - BRASIL**

**AGOSTO/2006**

Esta Dissertação foi submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Pesca, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

---

**GLACIO SOUZA ARAUJO**

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

---

**Professor Doutor Wladimir Ronald Lobo Farias**

**Orientador da Dissertação**

**Presidente**

---

**Professor Doutor Alexandre Holanda Sampaio**

**Conselheiro**

---

**Professora Doutora Ana Maria Sampaio Assreuy**

**Conselheira**

*Lucivânia e Valdeglácio,*

*meus pais.*

*Simplesmente,*

*devo tudo isso a eles.*

**“Ó meu Deus, fostes além da minha expectativa e por mim quero cantar vossas misericórdias.”**

**S. Teresinha do Menino Jesus**

**“Poderemos vencer sempre, uma vez que queremos combater.”**

**S. Francisco de Sales**

**“É atrevimento muito grande querer eu escolher caminho para mim. O mais seguro é não querer senão o que Deus quer.”**

**S. Teresa de Jesus**

## AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus, por tudo que existe, pela fortaleza e pelo encontro em todos os momentos da minha vida;

Ao Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias, pelo incentivo e concretização da minha vida acadêmica, além de pôr em prática seus valiosos conhecimentos;

Aos Professores Alexandre, Silvana, Manuel, Jarbas e Calíope, pelo apoio durante minha passagem pela universidade;

Aos meus amigos e alunos do Curso de Graduação e Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, em especial ao Anderson e Ariévilo, pela motivação nesta etapa;

Ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, em especial ao Laboratório de Planctologia e ao Laboratório de Bioquímica Marinha, pela utilização da parte física na realização de todo o experimento;

A Estação de Piscicultura Prof. Raimundo Saraiva da Costa do Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, pela doação da ração Fri-Ribe, utilizada neste experimento;

Ao Centro de Pesquisas Rodolpho von Ihering, do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – DNOCS, localizado na cidade de Pentecoste, CE, pela obtenção das larvas para o experimento;

A Estação de Piscicultura “Só Tilápia”, localizada na cidade de Horizonte, CE, pela doação das pós-larvas e do hormônio masculinizante utilizados neste experimento;

A Estação de Piscicultura Major Bruno, localizada na cidade de Pacajus, CE, pelo incentivo durante a realização desta e de outras pesquisas;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela ajuda financeira na realização desta pesquisa;

Enfim, a todos que não mencionei, mas fizeram parte da minha história, os meus mais sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xv</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Produção da aqüicultura no mundo	1
1.2. Produção da aqüicultura no Brasil	2
1.3. A tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	4
1.4. Considerações sobre o cultivo de tilápia	5
1.4.1. Oxigênio	5
1.4.2. Temperatura	6
1.4.3. Potencial hidrogeniônico da água (pH)	7
1.4.4. Amônia e nitrito	7
1.4.5. Salinidade	8
1.4.6. Alimentação natural	9
1.5. Produção de tilápias	10
1.6. A importância dos imunostimulantes na aqüicultura	12
1.7. Efeito imunostimulante de polissacarídeos sulfatados	15
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
3.1. Coleta das algas	20
3.2. Extração de polissacarídeos sulfatados totais	21
3.3. Incorporação dos polissacarídeos sulfatados na ração	21
3.4. Incorporação do hormônio na ração	22
3.5. Pós-larvas (pl's) de tilápia	23
3.6. Delineamento do experimento	23
3.7. Alimentação das pós-larvas durante o experimento	25
3.8. Indução da mortalidade durante o experimento	26
3.9. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água	27
3.10. Estresse dos peixes através do transporte	28
3.11. Análises estatísticas	28

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>29</b>
4.1. Extração dos polissacarídeos sulfatados	29
4.2. Peso médio das pós-larvas	29
4.3. Ganho médio de peso diário das pós-larvas	30
4.4. Mortalidade	33
4.5. Parâmetros físico-químicos da água	46
4.6. Transporte das pós-larvas	48
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>50</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>51</b>

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Produção brasileira de pescado e crescimento relativo, por setor, nos anos de 2003 e 2004.	3
Tabela 2. Produção brasileira de pescado e crescimento relativo, por setor, nos anos de 2003 e 2004.	4
Tabela 3. Níveis de garantia dos constituintes e seu percentual na ração voltada para o período de reversão sexual de tilápias.	25
Tabela 4. Alimentação de tilápias durante o período de reversão sexual utilizado em larviculturas comerciais (para 1.000 larvas).	26
Tabela 5. Peso médio das pós-larvas de tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , após a fase de reversão sexual.	29
Tabela 6. Ganho médio de peso diário das pós-larvas de tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , após a fase de reversão sexual.	30
Tabela 7. Mortalidade acumulada das pós-larvas de tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , até o final da fase de reversão sexual.	34
Tabela 8. Médias e desvios padrões das concentrações de oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura (°C) e pH da água de cultivo, e mortalidade total das pós-larvas, em todos os tratamentos, nas várias situações de estresse criadas durante o experimento.	47
Tabela 9. Sobrevivência dos alevinos de tilápias do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> , após o transporte.	48

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. 5
- Figura 2. Alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* depois de desidratada à luz solar. 20
- Figura 3. Vista completa dos aquários utilizados neste experimento. 24
- Figura 4. Pesos médios finais e ganhos médios de peso diário das pós-larvas ao final do experimento. Letras iguais sobre as barras de erro indicam ausência de diferença estatística ao nível de 5%. 31
- Figura 5. Mortalidade acumulada das pós-larvas de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, por tratamento, no final da reversão sexual (28 dias). Letras iguais sobre as barras de erro indicam ausência de diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%. 34
- Figura 6. Mortalidade semanal dos peixes, por tratamento, durante a fase de reversão sexual. Letras diferentes sobre as barras de erro indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5%. \* = pouco estresse; \*\* = estresse moderado. 37
- Figura 7. Mortalidade das pós-larvas de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, em todos os tratamentos, durante a última semana de reversão sexual e após cinco dias de estresse. Letras diferentes sobre as barras de erro indicam diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% (estresse\*\*) ou ao nível de 1% (estresse\*\*\*). \*\* = estresse moderado; \*\*\* = estresse elevado. 38

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\alpha$  – Nível de significância

$\pm$  - Desvio padrão

$^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius

$\mu\text{g}/\text{mL}$  – Micrograma por mililitro

17- $\alpha$ -metilttestosterona – Andrógeno masculinizante

ANOVA – Análise de Variância com Fator Único

$\text{Ca}^{2+}$  - Cálcio

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCA – Centro de Ciências Agrárias

$\text{Cl}^{-}$  - Cloreto

cm – Centímetro

CV – Cavalo

cv – Coeficiente de variação

Da – Dalton

DAP – Fosfato diamoniônicos

DEP – Departamento de Engenharia de Pesca

DGS – D-galactanas sulfatadas

DNOCS – Departamento Nacional de Obras Contra as Secas

EDTA – Etileno Diamino Tetra Acético Dissódico

FA – Ração com ingredientes de origem animal

FAA - Ração com ingredientes de origem vegetal com adição de aminoácidos lisina e metionina

FAO - Food And Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FP - Ração com ingredientes de origem vegetal com adição de cálcio e fósforo

FV - Ração com ingredientes de origem vegetal

g – Grama

$\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$  – Grama por dia

$\text{g}^{-1}$  – Por grama

h – Hora

$\text{HCO}_3^-$  - Bicarbonato

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IMNV – Vírus da Mionecrose Infecciosa

$\text{K}^+$  - Potássio

L – Litro

$\text{m}^2$  – Metro quadrado

MAP – Fosfato monoamoniônicos

mg – Miligrama

mg/g – Miligrama por grama

mg/kg - Miligrama por quilograma

mg/L – Miligrama por litro

mg/mL – Miligrama por mililitro

$\text{Mg}^{2+}$  - Magnésio

min – Minuto

mL – mililitro

mm – Milímetro

mM – milimolar

MT – Andrógeno 17- $\alpha$ -metiltestosterona

MT/kg – Andrógeno 17- $\alpha$ -metiltestosterona por quilograma

$\text{Na}^+$  - Sódio

$\text{NH}_3$  – Amônia

$\text{NO}_2^-$  - Nitrito

$\text{NO}_3^-$  - Nitrato

$\text{O}_2\text{D}$  – Oxigênio Dissolvido

PD – Proteína Digestível

pH – Potencial Hidrogeniônica da água

pl's – Pós-larvas

pl's/L – Pós-larvas por litro

ppm – Parte por milhão

PS – Polissacarídeo sulfatado

rpm – Rotações por minuto

$\text{SO}_4^{2+}$  - Sulfato

t – Tonelada

T1 – Tratamento 1

T2 – Tratamento 2

T3 – Tratamento 3

T4 – Tratamento 4

UFC – Universidade Federal do Ceará

WSSV – Vírus da Mancha Branca

XX – Fêmeas genotípicas normais

XY – Machos genotípicos normais

YY – Indivíduos super-machos

## RESUMO

Machos de tilápia chegam a crescer de 1,8 a 2,5 vezes mais rápido do que as fêmeas, sob condições de cultivo intensivo. Assim, as estratégias para obter populações monossexo estão focadas na produção de lotes de alevinos machos. A produção de indivíduos 100% machos através do uso do andrógeno 17- $\alpha$ -metiltestosterona é considerada a técnica mais efetiva e de menor custo. No entanto, o uso de hormônios e o aumento na densidade de cultivo tendem a afetar adversamente a saúde dos organismos cultivados, aumentando os índices de mortalidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de polissacarídeos sulfatados, extraídos da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata*, na sobrevivência e ganho de peso de pós-larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, submetidas à reversão sexual. O experimento consistiu em quatro tratamentos com três repetições cada, em um total de doze aquários com capacidade para 40L. Em cada tratamento foram utilizadas 960 pós-larvas (pl's) de tilápias, na densidade de estocagem de 8 pl's/L. No tratamento controle não foi utilizado o polissacarídeo e, nos outros três tratamentos, foram utilizadas doses crescentes (0,05, 0,1 e 0,2mg/g de peso vivo das larvas) do polissacarídeo na ração. Durante as duas primeiras semanas de reversão, foi utilizada aeração constante e uma renovação de água de 20% em cada repetição. A partir da terceira semana, foi elevado o estresse em todos os tratamentos através da supressão da aeração e/ou da renovação de água, a fim de induzir o aumento da mortalidade. Ao final do experimento, não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação ao peso médio final e ganho médio de peso diário das pós-larvas. No entanto, com relação à mortalidade, houve diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ ) no final da última semana de reversão e cinco dias após o experimento ( $\alpha = 0,01$ ), quando o estresse foi de moderado a elevado, respectivamente. Desta forma, as pl's que receberam a dose de 0,1 e 0,2mg/g se tornaram mais resistentes às situações de estresse induzidas no experimento.

## ABSTRACT

Under intensive culture conditions males of tilapia grow 1.8 to 2.5 times faster than females. Thus, strategies to get monosex populations are concentrated on male production fingerlings lots. The production of 100% males individuals through the use of the androgen 17- $\alpha$ -methyl-testosterone is considered the most effective and lesser cost technique. However, hormone administration and culture density enhancement tend to adversely affect cultivated organisms health, increasing mortality indices. The aim of this work was to evaluate the effect of sulfated polysaccharides extracted from the red marine alga *Gracilaria caudata* in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, post-larvae (pl's) survival and weight gain submitted to sexual reversion. The experiment consisted of four treatments with three repetitions in twelve 40L capacity aquariums. In each treatment were used 960 tilapias pl's in a stockage density of 8 pl's/L. In the control treatment was not used the polysaccharide and in the others three ones were used increasing doses (0.05, 0.1 and 0.2mg/g live weight) of the polysaccharide in the ration. During the two first weeks of reversion a constant aeration and a 20% water exchange were done in each treatment. In order to induce mortality, stress was raised in all treatments by aeration and/or water exchange suppression from the third week until the end of the experiment. Final mean weight and daily mean weight gain of pl's in all treatments did not showed significant difference at a 5% level. However, pl's mortality showed significant difference at the end of the last week of reversion ( $\alpha = 0.05$ ) and at the end of the last five days of the experiment ( $\alpha = 0.01$ ), when stress was raised of moderate to elevated, respectively. Then, pl's that received the polysaccharides doses of 0.1 and 0.2mg/g live weight became more resistant to stress situations induced in the experiment.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Produção da aquicultura no mundo**

A contribuição da aquicultura no mundo para produção de alimentos continua crescendo e a produção total aumentou de 3,9% em 1970 para 27,3% em 2000, mais rapidamente do que qualquer outra fonte de produção de alimentos. Desde 1970, este segmento produtivo vem crescendo a uma taxa média anual de 9,2%, comparados com somente 1,4% da pesca extrativa e 2,8% do cultivo de animais terrestres. Em 2000, a produção total da aquicultura, incluindo algas marinhas, foi de 45,7 milhões de toneladas e rendeu 56,5 bilhões de dólares (FAO, 2002).

No ano 2000, mais da metade da produção mundial da aquicultura originou-se de águas marinhas e estuarinas. A taxa de crescimento anual média para o período de 1970 a 2000 foi, porém, mais elevada para a produção de organismos de água doce. Embora a produção em águas marinhas tenha representado apenas 4,6% da produção total em biomassa, este valor representou 15,7% em termos de receita.

No ano de 2004, os principais países que lideraram a captura de organismos aquáticos foram: China, Peru, USA, Chile e Indonésia, com 16.892.793t, 9.613.180t, 4.959.826t, 4.935.376t e 4.811.320t, respectivamente. O Brasil ocupa a vigésima sexta colocação, com uma captura de 746.217t. Nesse ano a produção mundial total de captura de organismos aquáticos foi de 95.006.808t (FAO, 2005).

Com relação à aquicultura de peixes, crustáceos e moluscos no ano de 2004, destaca-se em primeiro lugar a China, com 30.614.968t. O Brasil ocupa a décima sétima colocação, com uma produção total de 269.699t. Nesse mesmo ano, a produção mundial total foi de 45.468.356t, e as principais espécies produzidas foram: a ostra *Crassostrea gigas* (4.429.337t), a carpa prateada, *Hypophthalmichthys molitrix* (3.979.292t), a carpa capim, *Ctenopharyngodon idellus* (3.876.868t), a carpa comum, *Cyprinos carpio* (3.387.918t), o mexilhão *Ruditapes philippinarum* (2.860.152t), a carpa cabeça-grande, *Hypophthalmichthys nobilis* (2.101.688t), a carpa *Carassius carassius* (1.949.758t), a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (1.495.744t), e o camarão *Penaeus vannamei* (1.386.382t) (FAO, 2005).

O maior produtor de plantas aquáticas em 2004 foi a China, com uma produção de 10.714.610t, correspondendo a 97% da produção mundial total de 13.927.067t (FAO, 2005).

## **1.2. Produção da aquicultura no Brasil**

Segundo o IBAMA (2005), a produção de pescado em 2004 no Brasil, que atingiu 1.015.914t, sofreu significativas variações quando comparada ao desempenho do setor no ano de 2003. Foi observado em 2004 um acréscimo de 2,6% na produção total (Tabela 1), determinado, principalmente, pelos desempenhos da pesca extrativa marinha e continental que apresentaram um crescimento de 3,2 e 8,2%, respectivamente. A aquicultura continental também apresentou um crescimento de 2% no mesmo período, entretanto a maricultura

decreceu em 11,9%, quando comparados aos dados obtidos no ano de 2003 (IBAMA, 2005).

Tabela 1. Produção brasileira de pescado e crescimento relativo, por setor, nos anos de 2003 e 2004.

Produção (t)	2003	2004	Crescimento relativo (%)
Pesca extrativa marinha	484.592,5	500.116,0	3,2
Pesca extrativa continental	227.551,0	246.100,5	8,2
Maricultura	101.003,0	88.967,0	-11,9
Aqüicultura continental	177.125,5	180.730,5	2,0
Total	990.272,0	1.015.914,0	2,6

No Brasil, a indústria da tilápia possui uma das maiores taxas de crescimento das Américas (FITZSIMMONS, 2000). Estima-se que a produção anual de tilápias oriunda da aqüicultura esteja entre 20 e 25 mil toneladas, e os cultivos concentrados nas regiões Sul e Sudeste (LOVSHIN, 2000). Por outro lado, fatores climáticos indicam o Nordeste do Brasil como uma área de elevado potencial para o desenvolvimento da aqüicultura, tendo o cultivo de tilápias um destaque especial. As estatísticas nacionais reforçam esta tese, visto que no período de 1995 a 1997, a Região Nordeste teve um incremento na produção aqüícola de 115,2%, enquanto que as regiões Sul e Sudeste cresceram somente 46,2 e 15,1%, respectivamente (BORGHETTI; OSTRENSKY, 1998).

A aqüicultura continental no Brasil, em 2004, apresentou crescimento nas regiões Norte (24,5%), Nordeste (20,1%) e Centro-Oeste (18,5%), em relação ao ano de 2003. Já a Região Sudeste apresentou um decréscimo de

14% e a Região Sul de 9,7%. As principais espécies de peixes utilizadas na aquicultura continental brasileira são a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, a carpa comum, *Cyprinus carpio*, o tambaqui, *Colossoma macropomum* e a curimatã, *Prochilodus nigricans*. A produção de pescado proveniente da aquicultura continental deve-se, em quase sua totalidade, à piscicultura, recebendo uma pequena contribuição do cultivo de crustáceos e anfíbios (IBAMA, 2005).

No Estado do Ceará, a espécie de peixe de água doce mais cultivada é a tilápia, tornando o valor da produção aquícola de outras espécies quase insignificante (Tabela 2).

Tabela 2. Produção das principais espécies de peixes de água doce cultivadas no Estado do Ceará, em 2004.

Espécies	Produção (t)
Tilápia	18.000,0
Tambaqui	149,0
Outros	32,5
TOTAL	18.181,5

Fonte: IBAMA (2005).

### 1.3. A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*

Nativa de diversos países africanos, a tilápia do Nilo ou tilápia nilótica é a espécie de tilápia mais cultivada no mundo todo. Essa espécie se destaca das demais pelo crescimento mais rápido e reprodução mais tardia, permitindo alcançar um maior tamanho antes da primeira maturação sexual. Além disso,

possui uma alta prolificidade, o que possibilita uma produção de grandes quantidades de alevinos. A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Figura 1) parece apresentar uma grande habilidade em filtrar as partículas de plâncton e quando cultivada em viveiros de águas verdes, essa espécie geralmente supera em crescimento e conversão alimentar, as demais espécies de tilápias (KUBITZA, 2000).



Figura 1. A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*.

#### **1.4. Considerações sobre o cultivo de tilápia**

##### **1.4.1. Oxigênio**

A concentração de oxigênio dissolvido é fundamental para assegurar o adequado desenvolvimento e a sobrevivência de peixes e camarões. A solubilidade do oxigênio na água varia de acordo com a temperatura,

salinidade e pressão atmosférica do local. Durante os cultivos de peixes e camarões, as concentrações de oxigênio dissolvido devem ser mantidas, preferencialmente, acima de 4mg/L (KUBTIZA, 2003).

As tilápias toleram baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água. Apesar da tremenda habilidade das tilápias em sobreviver algumas horas sob anoxia, quando são freqüentemente expostas a baixas concentrações de oxigênio dissolvido, ficam mais susceptíveis a doenças e apresentam crescimento reduzido (KUBTIZA, 2000).

#### **1.4.2. Temperatura**

A exigência em temperatura depende da espécie a ser cultivada e da fase de desenvolvimento em que se encontra (ovo, larva, pós-larva ou juvenil). As espécies de peixes tropicais normalmente apresentam ótimo crescimento a temperaturas de 26 a 30°C. O consumo de alimento, o crescimento e a tolerância ao manuseio e às doenças são afetados pelo aumento ou diminuição da temperatura. A tolerância das espécies que são cultivadas e a amplitude de variação da temperatura da água no local devem ser conhecidas, evitando problemas de crescimento e sobrevivência em função da exposição dos peixes a extremos de temperatura (KUBTIZA, 2003).

As tilápias apresentam conforto térmico entre 27 e 32°C e, abaixo de 27°C, reduzem o apetite e o crescimento. Abaixo de 20°C o apetite fica extremamente reduzido e aumentam os riscos de ocorrência de doenças. Com a temperatura da água abaixo de 18°C, o sistema imunológico das tilápias é suprimido e em temperaturas acima de 38°C ocorre mortalidade por estresse térmico (KUBTIZA, 2000).

### **1.4.3. Potencial hidrogeniônico da água (pH)**

Como regra geral, valores de pH próximos à neutralidade, entre 6,5 e 8,0, são mais adequados à produção de peixes. Valores de pH muito acima ou abaixo desta faixa podem causar prejuízos ao crescimento, à reprodução e à condição geral de saúde dos indivíduos. Condições extremas de pH podem ocasionar uma considerável mortalidade de peixes (KUBTIZA, 2003).

As tilápias apresentam uma baixa sobrevivência quando expostas em águas com pH abaixo de 4,0, mostrando sinais de asfixia com movimentos operculares acelerados e boquejamento na superfície. Esta exposição causa um aumento na secreção de muco, irritação e inchaço nas brânquias, culminando com a destruição do tecido branquial. Os peixes morrem com a boca aberta e apresentam os olhos saltados. Desta forma, o pH da água do cultivo de tilápias deve ser mantido entre 6,0 a 8,5, pois em valores de pH abaixo de 4,5 e acima de 10,5 a mortalidade é bastante significativa (KUBTIZA, 2000).

### **1.4.4. Amônia e nitrito**

A amônia ( $\text{NH}_3$ ) é um metabólito proveniente da excreção nitrogenada dos peixes e dos camarões, bem como da decomposição microbiana de resíduos orgânicos (restos de alimentos, fezes e adubos orgânicos). A aplicação de fertilizantes nitrogenados amoniacais, como o sulfato de amônio, o nitrato de amônio, a uréia e os fosfatos monoamônicos e diamônicos (MAP e DAP) também contribuem para o aumento da concentração de amônia na água. O nitrito ( $\text{NH}_2^-$ ) é um metabólito intermediário do processo de nitrificação durante o qual a amônia é oxidada a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), através da ação de

bactérias pertencentes aos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*. Condições de baixo oxigênio dissolvido prejudicam o desempenho das bactérias *Nitrobacter*, favorecendo o acúmulo de nitrito na água (KUBTIZA, 2003).

A amônia pode prejudicar o desempenho, aumentar a incidência de doenças e até mesmo causar a morte direta dos peixes por intoxicação. As concentrações que matam 50% dos animais em 24, 48 e 96 horas foram determinadas para tilápias vermelhas híbridas (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*) como sendo de 6,6mg/L, 4,0mg/L e 2,6mg/L, respectivamente. No entanto, valores de amônia não ionizada acima de 0,2mg/L já são suficientes para induzir uma toxicidade crônica, levando a uma diminuição do crescimento e da tolerância dos peixes a doenças. Assim, o ideal é manter a concentração de amônia não ionizada abaixo de 0,2mg/L durante o cultivo (KUBTIZA, 2000).

#### **1.4.5. Salinidade**

A salinidade é uma medida de concentração total de íons dissolvidos na água. Os principais íons presentes nas águas naturais são o sódio ( $\text{Na}^+$ ), o cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), o potássio ( $\text{K}^+$ ), o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), o magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), o sulfato ( $\text{SO}_4^{2+}$ ) e o bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). A água doce possui salinidade praticamente igual a zero, enquanto a água do mar pode ter salinidade variando entre 30 a 36mg/L. Diversas fontes de água apresentam salinidade intermediária entre a água doce e a água do mar (KUBTIZA, 2003).

Muitas espécies de tilápias são eurialinas, ou seja, conseguem se adaptar a diferentes condições de salinidade. Dentre as principais espécies cultivadas, a tilápia de Mossambique (*O. mossambicus*) e a tilápia do Zanzibar

(*O. eurolepus hornorum*) são as que apresentam maior tolerância à salinidade. Tanto *O. mossambicus* quanto *O. eurolepus hornorum* são capazes de se reproduzir na salinidade de 32mg/L. *O. mossambicus* se reproduz até mesmo em águas com 49mg/L. No entanto, a máxima produção de pós-larvas ocorre a 9mg/L, sendo três vezes maior do que a produção de pós-larvas em água doce, ou seja, em baixa salinidade (KUBTIZA, 2000).

Embora não sejam tão eurialinas quanto a *O. mossambicus* e a *O. eurolepus hornorum*, a tilápia azul (*O. aureus*) e a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) podem ser aclimatadas em água salgada. A tilápia do Nilo se reproduz normalmente em salinidade de até 15mg/L e seu crescimento em água com salinidade de 16 a 18mg/L é compatível ao observado em água doce (KUBTIZA, 2000).

#### **1.4.6. Alimentação natural**

As tilápias apresentam uma grande habilidade em aproveitar o alimento natural, na forma de fito e zooplâncton, que normalmente ocorrem no ambiente de cultivo (KUBTIZA, 2000). Além de servir como importante alimento para as pós-larvas e peixes juvenis, o fitoplâncton desempenha outras funções, dentre as quais merecem destaque: (1) a produção de oxigênio dissolvido através da fotossíntese; (2) a remoção do gás carbônico, da amônia e do fósforo presente na água, usando esses compostos como nutrientes para os processos de síntese de compostos orgânicos (carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas); (3) o sombreamento do fundo dos viveiros, impedindo o desenvolvimento de plantas aquáticas submersas e de algas filamentosas; e (4) o suporte ao desenvolvimento de uma comunidade heterogênea de microrganismos

aquáticos (fungos, bactérias, protozoários, zooplâncton, entre outros) que contribuem com o controle natural de potenciais organismos patogênicos, reduzindo os problemas de parasitoses e outras doenças (KUBTIZA, 2003).

### **1.5. Produção de tilápias**

Em cultivos intensivos e super-intensivos de tilápias (onde são utilizados uma maior densidade de estocagem dos indivíduos no ambiente de cultivo, maior controle da qualidade da água, manejo e alimentação completa e balanceada), os machos são preferencialmente utilizados por crescerem mais rapidamente e por direcionarem menos energia para a reprodução. Durante o processo de reprodução, as fêmeas de tilápias incubam os ovos e protegem as pós-larvas na boca, prolongando este cuidado parental intenso por duas ou mais semanas quando praticamente não se alimentam. Estas são as principais razões da diferença de crescimento entre machos e fêmeas. Sob condições de cultivo intensivo, os machos chegam a crescer de 1,8 a 2,5 vezes mais rápido do que as fêmeas. Assim, as estratégias para obter populações monossexo estão focadas na produção de lotes de alevinos machos (KUBITZA, 2000).

Durante os primeiros 15 a 30 dias de vida, as pós-larvas de tilápia ainda não possuem o sexo definido. Desta forma é possível, através da administração contínua de hormônios, obter populações masculinas ou femininas, de acordo com o tipo de hormônio utilizado.

A reversão de pós-larvas de tilápias para fêmeas é realizada apenas no auxílio a programas de melhoramento genético ou para a obtenção do super-macho. Essa técnica consiste na reversão sexual de pós-larvas com etinil

estradiol, transformando-as em fêmeas fenotípicas, que na realidade são machos genotípicos (XY) ou pseudo-machos. Quando esses machos se acasalam com fêmeas normais, produzem um quarto de indivíduos super-machos (YY). O acasalamento desses super-machos com fêmeas normais (XX) resultam em proles com 100% de machos normais (XY).

A grande dificuldade dessa técnica é a identificação dos animais super-machos (YY), o que geralmente pode ocasionar erros da avaliação culminando no fracasso da técnica (TAVE, 1988; SCOTT et al., 1989; RIBEIRO, 1998; SANTOS; SILVA, 1998; KUBTIZA, 2000).

A produção de indivíduos 100% machos através do uso do andrógeno 17- $\alpha$ -metiltestosterona é considerada a técnica mais efetiva e de menor custo (GUERRERO; GUERRERO, 1988), o que tem tornado mais usual nas fazendas comerciais, tendo sido um fator significativo no rápido crescimento da indústria da tilápia (PHELPS; POPMA, 2000).

A falta de qualidade (incluindo os baixos índices de reversão sexual), a inconstância na oferta de alevinos de tilápia e a baixa sobrevivência dos alevinos revertidos são atribuídas a diversos fatores, entre os quais, o emprego incorreto das técnicas de reversão sexual de tilápias, baixa inovação científica e tecnológica, demanda excessiva por alevinos revertidos, seleção inadequada de reprodutores, rações de má qualidade ofertadas para reprodutores e larvas, manejo inadequado e fatores ambientais, incluindo a qualidade inadequada da água (KUBTIZA, 2000).

A adição de hormônio masculino na ração para a reversão sexual de tilápias acarreta uma queda nas defesas imunológicas dos peixes, os quais

ficam sujeitos a doenças oportunistas, podendo afetar o crescimento e/ou a sobrevivência dos mesmos (FARIAS et al., 2004).

Vários esforços têm sido feitos para aumentar a produtividade na aqüicultura. O aumento na densidade de cultivo tende a afetar adversamente a saúde dos organismos cultivados. Tais condições proporcionam um ambiente desfavorável para os peixes tornando-os susceptíveis às infecções (SAKAI, 1999).

Recentes evidências e as experiências acumuladas em larviculturas comerciais sugerem que as bactérias, presentes regularmente nos laboratórios de produção de larvas, podem ser a principal causa de problemas associados com a produção de juvenis (VADSTEIN et al., 1993).

### **1.6. A importância dos imunoestimulantes na aqüicultura**

Nos últimos anos, tem crescido o interesse científico na investigação e identificação de compostos com atividade biológica oriundos de organismos aquáticos com aplicabilidade em vários ramos da ciência. Dentre esses compostos, os imunoestimulantes podem ser citados. Essas substâncias têm sido cada vez mais utilizadas na aqüicultura, devido à grande variedade de parasitas, fungos, bactérias e vírus que afetam a produção dos organismos aquáticos, causando grandes perdas econômicas (TINMAN et al., 2000).

O surgimento de enfermidades nos cultivos apresenta-se como um obstáculo ao sucesso da aqüicultura, já que várias doenças bacterianas, virais e fúngicas atingem a produção larval dos organismos. Desta forma, uma larvicultura de qualidade necessita de uma boa nutrição, eficientes técnicas de

manejo, monitoramento de reprodutores e das próprias larvas e uso de animais selecionados, criando, assim, resistência a essas infecções (BACHÈRE, 2003).

A larvicultura de peixes está marcada por elevadas taxas de mortalidade e a maior parte dessas mortes está relacionada com doenças infecciosas. Diante disto, deve-se desenvolver estratégias para controlar estes patógenos, melhorando a saúde das larvas. Para este fim, existem muitas substâncias a serem administradas, tais como os  $\beta$ -glucanos, produtos bacterianos, polissacarídeos entre outros, que podem ativar os mecanismos de defesa das mesmas. O uso de imunostimulantes como suplementos em dietas podem fornecer resistência aos patógenos durante períodos de estresses elevados e melhorar a sobrevivência dos peixes durante a fase larval (BRICKNELL; DALMO, 2005).

Os imunostimulantes previnem doenças em peixes e crustáceos, podendo ser muito úteis na aquicultura. Na única revisão sobre o assunto, SAKAI (1999) relatou diversos trabalhos sobre o uso de imunostimulantes em peixes e crustáceos. Esses compostos ativam, principalmente, a função fagocítica das células de defesa e elevam suas atividades bacteriostáticas. A ativação das funções imunológicas está associada com o aumento da proteção contra doenças infecciosas a diversos patógenos. Além disso, os imunostimulantes podem diminuir os efeitos negativos dos hormônios sexuais no sistema imunológico.

Além do aumento da resistência aos patógenos, que reduz a mortalidade dos peixes, o tratamento preventivo com imunostimulantes evita os problemas da poluição ambiental causada pelo uso de drogas como antibióticos e outras substâncias químicas (PARK; JEONG, 1996).

MOULLAC; HAFFNER (2000) avaliaram alguns efeitos de mudanças ambientais na resposta imune em crustáceos, principalmente nos camarões. Tais mudanças ocorrem devido a variações no ambiente de cultivo provocadas por contaminantes químicos e mudanças físico-químicas da água, se refletindo no sistema imune dos camarões alterando as contagens totais e diferenciais de hemócitos, a resistência bacteriana e a atividade fagocítica.

Alguns trabalhos utilizando imunoestimulantes em camarões foram relatados, como ESPINOSA et al. (2002) quando examinaram o sistema de defesa do camarão *Litopenaeus schmitii* através da análise de diversos parâmetros, como atividade hemaglutinante da hemolinfa, número de hemócitos totais e produção de óxido nítrico, com o intuito de propor o uso de técnicas capazes de protegê-los de alguns patógenos que possam ocorrer durante o cultivo. Os autores demonstraram que a atividade hemaglutinante da hemolinfa pode ser usada como indicador de saúde e adaptação dos organismos às condições de cultivo. Os resultados mostraram ainda que diferentes condições de estresse causam um aumento exponencial no número de hemócitos em circulação e um aumento na concentração de óxido nítrico na hemolinfa, que é um mecanismo de defesa importante para o camarão *L. schmitii*.

O sucesso do cultivo de camarões depende da qualidade e saúde das pós-larvas. As melhorias na higiene e biossegurança, o uso de probióticos e de imunoestimulantes, e o cuidado com a alimentação artificial resgatarão a confiabilidade e, conseqüentemente, diminuem o custo de produção. As novas epidemias virais estão crescendo rapidamente e espalham-se por muitas regiões, causando impactos significativos na viabilidade da aquicultura. Os

esforços da pesquisa e o desenvolvimento dos animais em ciclos fechados de produção são cada vez mais visados. Com isso, deve-se incentivar o controle e a resistência a doenças, bem como a otimização do crescimento (BROWDY, 1998).

Alguns imunostimulantes utilizados em peixes e camarões são polissacarídeos neutros como os glucanos, obtidos de parede celular de leveduras e bactérias (ROBERTSEN et al., 1990; PARK; JEONG, 1996; ITAMI et al., 1998; CHANG et al., 2000; TINMAN et al., 2000; COUSO et al., 2003; BAGNI et al., 2005), a quitina, presente no exoesqueleto de crustáceos, e a quitosana derivada da quitina (KAWAKAMI et al., 1998; SAKAI, 1999; BULLOCK et al., 2000; ESTEBAN et al., 2001; GOPALAKANNAN; ARUL, 2006).

Os  $\beta$ -glucanos são polissacarídeos que agem como estimuladores não-específicos do sistema imune, resultando em proteção contra infecções oportunistas. Em geral, eles apresentam baixo poder toxicológico e têm sido usados na imunoterapia de tumores malignos (CROSS et al., 2001).

A quitosana é um produto da deacetilação da quitina. Na aquicultura, a quitosana é usada como um imunostimulante para proteção de doenças bacterianas em peixes, para fabricação de vacinas e como dieta suplementar (BULLOCK et al., 2000).

### **1.7. Efeito imunostimulante de polissacarídeos sulfatados**

Recentemente, alguns trabalhos têm mostrado o efeito imunostimulante, tanto em peixes como em camarões, de polissacarídeos

sulfatados ou farinha de macroalgas (MILES et al., 2001; RIVERA et al., 2002; CASTRO et al., 2003; CHOTIGEAT et al., 2004; FARIAS et al., 2004; BAGNI et al., 2005; HUANG et al., 2006) e microalgas marinhas (NANDEESHA et al., 2001; CAMPA-CÓRDOVA et al., 2002; LEE et al., 2003; BAGNI et al., 2005; WATANUKI et al., 2006).

Os polissacarídeos sulfatados são conhecidos, principalmente, por apresentarem atividades anticoagulantes e antitrombóticas, no entanto eles são capazes de exercer uma série de outras atividades tais como antiviral, antitumoral, antimetastática, antiproliferativa, anti-inflamatória, pró-inflamatória, imunomodulatória entre outras (BOISSON-VIDAL et al., 1995).

Os polissacarídeos sulfatados ocorrem em algas marinhas na forma de fucanas nas algas pardas (fucoidanas), como galactanas nas algas vermelhas (carragenanas e ágares) e como arabino-galactanas nas algas verdes (PERCIVAL; McDOWELL, 1967).

A carragenana, por exemplo, é um poderoso polímero aniônico, com peso molecular de 100.000 Da, derivada de algumas espécies de algas marinhas vermelhas, sendo geralmente usada para estabilização da textura dos alimentos. Esta molécula não é degradada pelo sistema gastrointestinal de mamíferos, no entanto sua administração pode apresentar uma variedade de efeitos, particularmente no sistema imune (COHEN, 2002).

FARIAS (2000) encontrou atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados extraídos de quatro espécies de algas vermelhas e em duas verdes: *Cladophora vagabunda* e *Caulerpa sertularioides*, coletadas no Estado do Ceará. As algas vermelhas *Gelidiopsis gracilis*, *Champia feldmannii* e *Botryocladia occidentalis* apresentaram uma alta atividade anticoagulante,

sendo que *B. occidentalis* apresentou, praticamente, a mesma atividade encontrada para a heparina de baixo peso molecular. No mesmo ano, FARIAS et al. (2000) mostraram que o polissacarídeo de *B. occidentalis* é uma galactana sulfatada com um padrão de sulfatação bem variável, mas com uma clara predominância de resíduos 2,3-di-O e 2-O-sulfatados, os quais amplificam a atividade anticoagulante. Além disso, essa galactana possui atividade antitrombótica que é diretamente dependente de uma dose ideal, desaparecendo com doses mais elevadas (FARIAS et al., 2001).

Com o objetivo de avaliar um possível efeito imunoestimulante dos polissacarídeos sulfatados de *B. occidentalis*, REBOUÇAS et al. (2002) administraram, na dieta de pós-larvas de tilápias, diferentes dosagens desses polissacarídeos, sendo observado um aumento significativo no crescimento dos peixes em uma determinada dose. No entanto, a duplicação da dose não resultou em um aumento do crescimento nos animais (FARIAS et al., 2004). Os polissacarídeos sulfatados de *B. occidentalis* também foram utilizados em pós-larvas do camarão *L. vannamei*, submetidas ao estresse, na forma de banhos de imersão (BARROSO, 2005) e incorporados na ração de camarões *L. vannamei* infectados com o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), causador da mionecrose infecciosa (COSTA et al., 2006), sendo observado, em ambos os casos, um aumento significativo da sobrevivência dos indivíduos.

Os polissacarídeos sulfatados de microalgas também apresentam atividade imunoestimulante. Como exemplo, pode ser citada a atividade imunoestimulante dos polissacarídeos sulfatados extraídos de uma microalga cianofíceia, *Cyanothece* sp., a qual foi demonstrada por CAMPA-CORDOVA et al. (2002). Os autores mostraram que a administração desses polissacarídeos,

na forma de banhos de imersão, em camarões adultos foi capaz de aumentar a atividade da enzima superóxido dismutase e a produção do ânion superóxido. Além disso, esse efeito foi obtido utilizando uma dose 500 vezes menor do que a utilizada para o  $\beta$ -glucano.

A microalga cianofícea *Spirulina platensis* possui um polissacarídeo sulfatado denominado de cálcio-spirulam que apresenta uma potente atividade antiviral e uma baixa atividade anticoagulante (HAYASHI et al., 1996). O polissacarídeo sulfatado extraído dessa microalga também apresentou efeito imunestimulante, ativando o sistema imune inato de humanos através do aumento da produção de interferon e da citotoxicidade das células "natural killer" (células matadoras) (HIRAHASHI et al., 2002).

Como é possível observar, existe um grande potencial de polissacarídeos sulfatados com atividade biológica presentes, tanto em macro quanto em microalgas marinhas. Desta forma, a investigação das propriedades imunestimulantes dessas moléculas se faz necessário, dada a grande diversidade de algas presentes no litoral brasileiro e o aumento de doenças em organismos aquáticos cultivados.

O uso de imunestimulantes durante a reversão sexual da tilápia do Nilo, *O. niloticus*, poderia otimizar a sobrevivência e/ou a taxa de crescimento das pós-larvas, melhorando assim a produtividade na fase de engorda.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da adição de polissacarídeos sulfatados, extraídos da macroalga marinha vermelha *Gracilaria caudata*, na ração de pós-larvas de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, submetidas à reversão sexual com o hormônio masculino 17- $\alpha$ -metiltestosterona.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta das algas

Exemplares da alga marinha vermelha *G. caudata* (Figura 2) foram coletados na praia do Pacheco, Caucaia, CE, sendo selecionadas plantas tão limpas quanto possível. As algas foram colocadas em sacos plásticos e transportadas imediatamente para o laboratório, sendo então lavadas com água destilada, a fim de eliminar outros organismos e epífitas. Em seguida, o material foi desidratado ao sol e cortado em pequenos pedaços.



Figura 2. Alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* depois de desidratada à luz solar.

### **3.2. Extração de polissacarídeos sulfatados totais**

Para a extração de polissacarídeos sulfatados, foram hidratados 2g de algas secas utilizando 100mL de tampão acetato de sódio 100mM pH 5,0 + cisteína 5mM + EDTA 5mM e a mistura foi incubada com uma solução de papaína (30mg/mL) a 60°C em banho maria, por 24 horas. Em seguida, a mistura foi filtrada e, ao sobrenadante, foram adicionados três volumes de etanol absoluto, ficando em repouso por 24h a -10°C. Após esse período, o material foi centrifugado (2.500 rpm; 20min; 4°C), modelo J2-21 da Beckman, e o precipitado lavado duas vezes com 200mL de etanol 80% e uma vez com 120mL de etanol absoluto. Finalmente, o material foi seco em estufa a 60°C, sendo obtidos os polissacarídeos sulfatados totais.

### **3.3. Incorporação dos polissacarídeos sulfatados na ração**

Para a incorporação dos polissacarídeos sulfatados na ração, inicialmente, eles foram pesados em uma balança semi-analítica modelo MARK 500 da Bel Engineering e dissolvidos em água destilada, utilizando-se um agitador magnético. Em seguida, a solução foi usada para umedecer uniformemente a ração seca até a obtenção de uma massa úmida e consistente. Posteriormente, a ração foi distribuída em várias placas de Petri e levada à estufa a 60°C por 24 horas. Após a completa secagem da ração, ela foi triturada em um liquidificador comercial e peneirada até atingir a granulometria original.

Para se determinar a quantidade de polissacarídeos sulfatados a serem utilizados em cada repetição, inicialmente foi calculada a biomassa das pós-larvas a partir da seguinte fórmula:

Biomassa = número de indivíduos na repetição x W, sendo W o peso médio obtido pela equação abaixo, descrita por PHELPS; POPMA (2000):

$$W = 0,02 \times L^3; \text{ onde } L \text{ é o comprimento médio das pós-larvas.}$$

Finalmente, a quantidade de polissacarídeo foi calculada multiplicando-se a biomassa obtida por cada dosagem a ser administrada nos três tratamentos, sendo utilizado um total de 236mg de polissacarídeos sulfatados em todo o experimento.

#### **3.4. Incorporação do hormônio na ração**

Inicialmente, foi preparada uma solução estoque do hormônio 17- $\alpha$ -metiltestosterona, pela dissolução de 1g em 1L de álcool etílico absoluto (99,8%). Dessa solução estoque, foram retirados 123mL e acrescentados mais 820mL de etanol absoluto.

Para a incorporação do hormônio na ração, ela foi pesada em uma balança semi-analítica modelo MARK 500 da Bel Engineering e distribuída em bandejas plásticas. Em seguida, a solução contendo o hormônio foi lançada aos poucos sobre a ração, misturando-se manualmente para uma perfeita homogeneização. Esse procedimento foi executado com luvas e máscaras,

para evitar o contato do hormônio com a pele e mucosas. Após a mistura, a ração contendo o hormônio foi espalhada em camadas de 5cm de espessura e abrigada da luz solar direta durante um período de 48 horas, para a completa evaporação do álcool. Ao final deste processo, a ração foi passada em uma peneira para retornar a sua granulometria original.

### **3.5. Pós-larvas (pl's) de tilápia**

As pós-larvas utilizadas nesse estudo foram obtidas em uma Estação de Piscicultura, localizada no distrito de Queimadas, na cidade de Horizonte, CE.

Os indivíduos foram coletados através da técnica de coleta de nuvens, utilizando uma tela de 1,5mm de abertura de malha, após 20 dias de estocagem de 250 reprodutores e 600 reprodutrices, em um viveiro de reprodução de 1.500m<sup>2</sup> (30m x 50m). Em seguida, as pós-larvas foram transportadas por via terrestre até o laboratório em um saco plástico, contendo água e oxigênio.

Ao chegar no laboratório, o peso médio das larvas foi determinado a partir da pesagem de 100 indivíduos em uma balança semi-analítica modelo MARK 500 da Bel Engineering. Assim, um total de 3.840 larvas, com peso médio de 0,012g foram utilizadas no experimento.

### **3.6. Delineamento do experimento**

O experimento foi realizado no Laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da

Universidade Federal do Ceará (DEP/CCA/UFC) e consistiu em quatro tratamentos com três repetições cada, em um total de doze aquários com capacidade para 40L (Figura 3).



Figura 3. Vista completa dos aquários utilizados neste experimento.

Em cada repetição foram utilizadas 320 pl's, na densidade de estocagem de 8 pl's/L. No tratamento controle (T1) foi utilizada ração sem o polissacarídeo e, nos outros três tratamentos, foram utilizadas doses crescentes (0,05, 0,1 e 0,2mg/g de peso vivo das larvas – T2, T3 e T4, respectivamente) do polissacarídeo na ração.

Diariamente, os indivíduos mortos em cada aquário foram contados, com o intuito de se verificar a mortalidade ao final do experimento. Também ao final do experimento, foi determinado o peso médio dos peixes, através de uma pesagem de 25 indivíduos em cada repetição, utilizando uma balança semi-analítica modelo MARK 500 da Bel Engineering Ltda, verificando, assim, o ganho de peso em todos os tratamentos.

### 3.7. Alimentação das pós-larvas durante o experimento

As pós-larvas foram alimentadas com ração balanceada farelada, contendo 50% de proteína bruta (Tabela 3) e 60mg/kg do hormônio 17- $\alpha$ -metiltestosterona. A quantidade de ração administrada teve como base os valores práticos utilizados em larviculturas comerciais (Tabela 4). A ração foi fornecida, diariamente, em quatro refeições (9, 11, 14 e 16h), sendo lançada diretamente na água.

Tabela 3. Níveis de garantia dos constituintes e seu percentual na ração voltada para o período de reversão sexual de tilápias.

Constituintes (valores mínimos)	%
Proteína Bruta	50,0
Extrato etéreo	8,0
Fibras	6,0
Minerais	11,0
Cálcio	3,5
Fósforo	1,0
Umidade	12,0

Tabela 4. Alimentação de tilápias durante o período de reversão sexual utilizado em larviculturas comerciais (para 1.000 larvas).

Dias	Comprimento médio (mm)	Quantidade de ração (g.dia <sup>-1</sup> )
1	8,0	2,0
2	8,0	2,0
3	9,0	3,0
4	9,0	3,0
5	10,0	4,0
6	10,0	4,0
7	11,0	5,0
8	11,0	5,0
9	12,0	6,0
10	13,0	7,0
11	14,0	8,0
12	15,0	10,0
13	16,0	11,0
14	17,0	13,0
15	18,0	15,0
16	19,0	16,0
17	20,0	17,0
18	21,0	19,0
19	22,0	21,0
20	23,0	23,0
21	24,0	25,0
22	25,0	27,0
23	26,0	29,0
24	27,0	30,0
25	28,0	30,0
26	>28,0	30,0
27	>28,0	30,0
28	>28,0	30,0
TOTAL		425,0

### 3.8. Indução da mortalidade durante o experimento

Durante as duas primeiras semanas de reversão sexual, foi utilizada aeração constante, fornecida através de dois sopradores com potência de 5 CV cada e renovação diária de 20% da água dos aquários, caracterizando uma situação com ausência de estresse. Com o intuito de induzir a mortalidade dos

alevinos foram criadas, após a 2ª semana de reversão sexual, três situações de estresse, as quais foram denominadas de pouco estresse (estresse\*), estresse moderado (estresse\*\*) e estresse elevado (estresse\*\*\*). A situação de pouco estresse foi criada, durante a 3ª semana do experimento, suprimindo-se a aeração durante o período diurno, sendo mantida a renovação de água e a aeração no período noturno. Durante a última semana de reversão sexual (4ª semana do experimento), foi estabelecida a situação de estresse moderado abolindo-se completamente a aeração, mas mantendo-se a renovação de água. Finalmente, foi criada a situação de estresse elevado que se caracterizou pela ausência de aeração e de renovação de água.

Durante todo o experimento, foi utilizado um fotoperíodo de 10 horas de claro e 14 horas de escuro, e a temperatura da sala foi mantida em torno de 30°C.

### **3.9. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água**

Semanalmente, foram determinados a temperatura da água, o pH e o oxigênio dissolvido em cada repetição, utilizando uma sonda polarográfica estável, modelo YSI F-1550A da Bernauer Aquacultura, com precisão de  $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$  para a medição da temperatura da água e  $\pm 2\%$  de ar saturado ou 2% da leitura, para a medição do oxigênio dissolvido. Para a determinação do pH foi utilizado um indicador de pH de modelo F-1005 da Bernauer Aquacultura.

### **3.10. Estresse dos peixes através do transporte**

Ao final do experimento, foi verificado o estresse dos peixes ao se realizar um transporte de 300 indivíduos em cada tratamento, utilizando-se sacos plásticos contendo 3L de água e oxigênio atmosférico com o objetivo de avaliar a sobrevivência dos indivíduos. O transporte foi realizado por via terrestre e teve a duração de duas horas e 30 minutos. Ao final do transporte, os indivíduos mortos foram contados e os sobreviventes foram estocados em berçários com abertura de malha de 1,5mm.

### **3.11. Análises estatísticas**

As médias de pesos finais, ganhos de pesos diários e mortalidade foram submetidas a uma análise de variância com fator único (ANOVA) e, posteriormente, ao teste  $t$  não pareado para médias.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Extração dos polissacarídeos sulfatados

A quantidade de polissacarídeos sulfatados obtida de 2g da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* durante a primeira extração foi 630mg, o que correspondeu a um rendimento de 31,5%. O resíduo obtido da primeira extração e utilizado para uma re-extração resultou em 93mg de polissacarídeo (6,79%) (ARAUJO; FARIAS, 2004).

### 4.2. Peso médio das pós-larvas

O peso médio das pós-larvas ao final da reversão sexual (28 dias), variou de 0,182g no tratamento T2 a 0,220g no tratamento T4 (Tabela 5).

Tabela 5. Peso médio das pós-larvas de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, após a fase de reversão sexual.

		Peso médio (g)				Média e Desvio Padrão
		Repetições				
cv (%)	Trat.	1	2	3		
5,20	T1	0,183	0,183	0,200	0,189±0,0098	
3,70	T2	0,182	0,196	0,188	0,189±0,0070	
2,98	T3	0,197	0,189	0,186	0,191±0,0057	
18,50	T4	0,220	0,153	0,177	0,183±0,0034	

Os pesos médios finais dos três tratamentos e o controle não apresentaram diferenças significativas e foram bastante semelhantes aos encontrados por HAYASHI et al. (2002) ao determinarem a exigência de proteína digestível (PD) para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, durante a fase de reversão sexual com o hormônio 17- $\alpha$ -metiltestosterona. Os autores obtiveram, ao final do experimento, pesos médios de 0,192, 0,219, 0,273, 0,244 e 0,201g para níveis de 30, 34, 38, 42 e 46% de PD, respectivamente.

#### 4.3. Ganho médio de peso diário das pós-larvas

O ganho médio de peso diário das pós-larvas ao final do experimento (28 dias) variou de 5,50mg no tratamento T4 a 7,90mg também no tratamento T4 (Tabela 6).

Tabela 6. Ganho médio de peso diário das pós-larvas de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, após a fase de reversão sexual.

		Ganho médio de peso diário (mg)				Média e Desvio Padrão
		Repetições				
cv (%)	Trat.	1	2	3		
5,10	T1	6,54	6,54	7,14	6,74 $\pm$ 0,35	
3,70	T2	6,50	7,00	6,70	6,73 $\pm$ 0,25	
2,98	T3	7,00	6,75	6,60	6,78 $\pm$ 0,20	
18,6	T4	7,90	5,50	6,30	6,57 $\pm$ 1,22	

HAYASHI et al. (2002) obtiveram ganhos de pesos médios diários de 6,86, 7,82, 9,75, 8,71 e 7,17mg quando testaram, durante a reversão sexual de tilápias, rações com 30, 34, 38, 42 e 46% de proteína digestível, respectivamente. Em um outro trabalho sobre a influência da temperatura na reversão sexual de tilápias, BORGES et al. (2005) encontraram ganhos de pesos médios diários variando de 3,20 a 7,96mg. Esses resultados também foram bastante semelhantes aos encontrados no presente experimento. Como é possível observar na Figura 4, os valores dos pesos médios finais e dos ganhos de pesos médios diários não variaram muito ao final do experimento e a análise de variância (ANOVA) não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos ao nível de 5%.

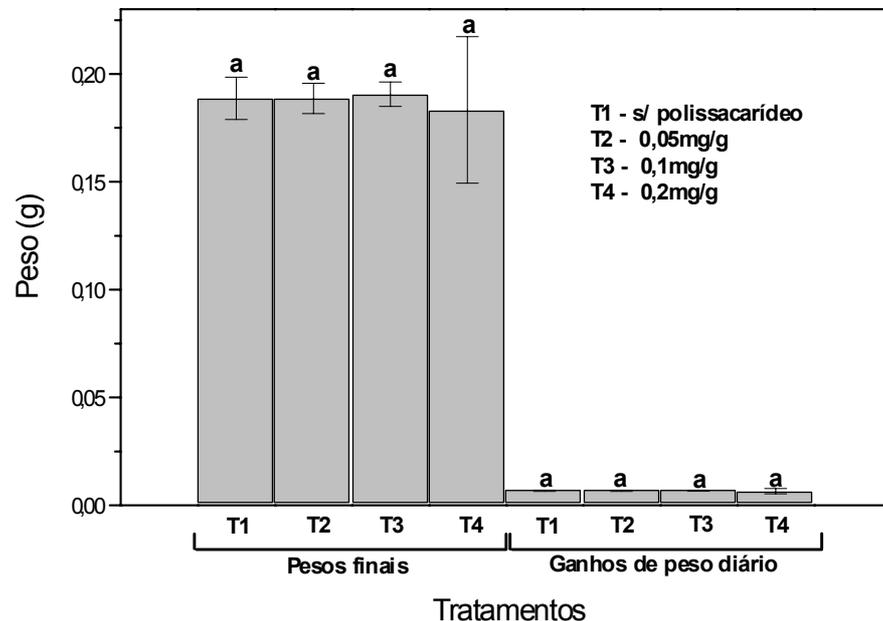


Figura 4. Pesos médios finais e ganhos médios de peso diário das pós-larvas ao final do experimento. Letras iguais sobre as barras de erro indicam ausência de diferença estatística ao nível de 5%.

FARIAS et al. (2004) adicionaram D-galactanas sulfatadas (DGS) da alga marinha vermelha *B. occidentalis* na ração de tilápias do Nilo, *O. niloticus*, durante a fase de reversão sexual, utilizando bandejas e uma elevada densidade de estocagem como fator estressante. Foram realizados quatro procedimentos experimentais utilizando 0,05, 0,1 e 0,2mg DGS/g de peso vivo e um controle sem DGS. Em nosso estudo, após a 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas do início do experimento, foram observados os maiores valores de peso médio final e ganho de peso nos peixes que receberam a dose de 0,1mg DGS/g. A administração de uma dose mais elevada (0,2mg DGS/g) não aumentou o ganho de peso. Além disso, foi observada uma elevada mortalidade nas primeiras semanas da reversão devido à alta densidade de estocagem e escape de pós-larvas, não existindo diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.

A microalga cianofícea *S. platensis* foi adicionada à dieta de duas espécies de carpa, *Catla catla* e *Labeo rohita*, em 90 dias de cultivo (NANDEESHA et al., 2001). Foram realizados 4 tratamentos, substituindo em 25, 50, 75 e 100% a proteína contida na ração pela microalga e um controle sem substituição. Os resultados mostraram que a adição de 25% de *Spirulina platensis* na dieta resultou em um crescimento significativamente superior da espécie *L. rohita*. No entanto, a utilização de 100% de *S. platensis* não resultou em um maior crescimento. Com relação à composição da carcaça, os peixes alimentados com a microalga apresentaram, de uma maneira geral, um elevado percentual de gordura. Embora os autores tenham trabalhado com a microalga intacta, não se pode descartar uma possível ação do polissacarídeo sulfatado.

Recentemente, o efeito imunoestimulante da administração da microalga *S. platensis*, na dieta de carpas comuns, *C. carpio*, foi comprovada através de um aumento das defesas não específicas dos animais. Os resultados mostraram que a adição da microalga aumentou a atividade fagocitária e a produção do ânion superóxido nas células renais dos peixes (WATANUKI et al., 2006).

Em camarões, também foram observados efeitos positivos com relação ao ganho de peso após a administração de algas na dieta. RIVERA et al. (2002) alimentaram juvenis de *L. vannamei* com peso médio de 0,4g durante 25 dias, com uma dieta contendo 10, 15 e 20% de farinha da alga marinha parda *Macrocystis pyrifera*, e um controle sem sua utilização. O peso médio final, o crescimento e a biomassa foram maiores no tratamento que continha 10% de farinha de alga, do que no tratamento controle e nos demais tratamentos. O consumo de alimento foi mais elevado nos tratamentos com 15 e 20% de inclusão de farinha de alga e a taxa instantânea de crescimento praticamente não variou entre os tratamentos.

#### **4.4. Mortalidade**

A mortalidade acumulada ao final da reversão sexual não apresentou diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% e foi relativamente baixa entre os tratamentos, variando de 6,05% no tratamento T3 a 8,22% no T1 (Tabela 7, Figura 5).

Tabela 7. Mortalidade acumulada das pós-larvas de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, até o final da fase de reversão sexual.

Tratamentos	Mortalidade acumulada nos dias de cultivo (%)				
	0	8	15	21	28
T1	0	2,5	5,1	5,93	8,22
T2	0	3,02	5,73	6,35	7,29
T3	0	3,44	5,63	5,84	6,05
T4	0	3,44	5,32	5,94	6,77

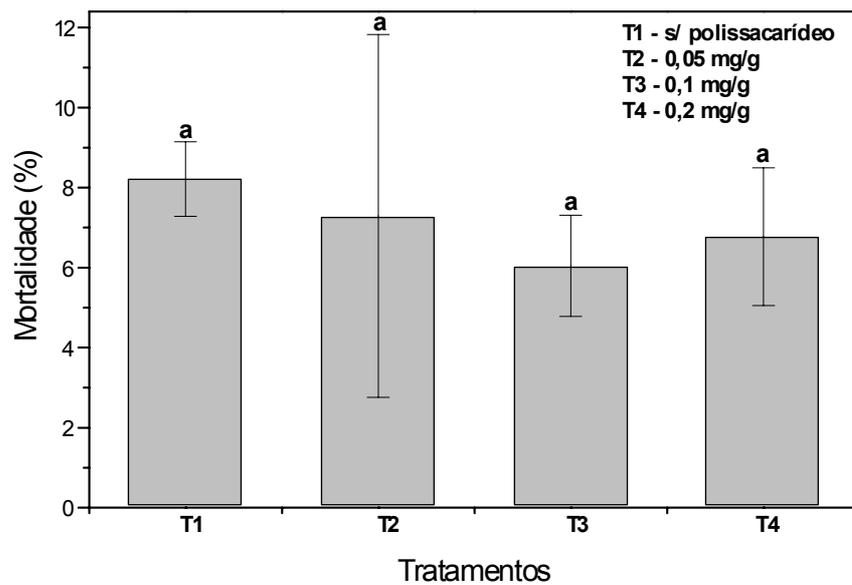


Figura 5. Mortalidade acumulada das pós-larvas de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, por tratamento, no final da reversão sexual (28 dias). Letras iguais sobre as barras de erro indicam ausência de diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%.

No experimento de reversão sexual conduzido por HAYASHI et al. (2002) a mortalidade aumentou linearmente com aumento nos níveis de Proteína Digestível (PD), sendo 14,4, 13,0, 16,0, 19,5 e 21,5% para níveis de 30, 34, 38, 42 e 46% de PD, respectivamente, após 28 dias de tratamento hormonal.

MAINARDES-PINTO et al. (2000) compararam a eficiência de duas rações comerciais, ambas com 40% de proteína bruta, contendo duas diferentes doses do andrógeno sintético 17- $\alpha$ -metiltestosterona (MT) na reversão sexual da tilápia do Nilo, *O. niloticus*. Os autores utilizaram os seguintes tratamentos, por um período de 45 dias: A - 30mg de MT/kg de ração 1; B - 60mg de MT/kg de ração 1; C - 30mg de MT/kg de ração 2; D - 60mg de MT/kg de ração 2 e dois grupos controle: E e F, rações 1 e 2, respectivamente, sem hormônio. A mortalidade, após a reversão sexual, foi de 40% para o tratamento A, 30% tratamento B, 35% tratamento C, 32% tratamento D, 35% tratamento E e 30% para os tratamento F.

MEURER et al. (2005) compararam o efeito da origem da fonte protéica e da suplementação com lisina e metionina ou cálcio e fósforo para a tilápia do Nilo, *O. niloticus*, durante a reversão sexual. Os tratamentos foram compostos por quatro rações isoprotéicas e isoenergéticas: uma somente com ingredientes de origem animal (FA); outra com ingredientes de origem vegetal (FV) e duas com ingredientes de origem vegetal, uma com adição de aminoácidos lisina e metionina (FAA) e outra com cálcio e fósforo (FP). Os resultados mostraram que as mortalidades dos tratamentos FA, FV e FP foram semelhantes entre si e superiores ao FAA, apresentando os seguintes valores: 10% para FA, 6% para FV, 30% para FAA e 12% para FP.

TACHIBANA et al. (2004) compararam o desempenho e a sobrevivência de quatro linhagens de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, durante a fase de reversão sexual. Os peixes foram alimentados com ração contendo 60mg/kg de 17- $\alpha$ -metiltestosterona, fornecida 6 vezes ao dia, durante 30 dias. O experimento consistiu em 4 tratamentos (linhagens) com 7 repetições. Ao final do experimento, observaram-se menores taxas de mortalidade nas linhagens Santa Catarina e Pernambuco quando comparadas com a CESP e a Tailandesa, sendo estas 36,67% para CESP, 39,05% para Pernambuco, 11,9% para Tailandesa e 7,14% para Santa Catarina.

RIVERA et al. (2002) verificaram que a sobrevivência e a taxa de conversão alimentar de juvenis de camarões *L. vannamei* foram similares ao controle e muito melhores que a dos outros tratamentos.

Em uma larvicultura de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, a sobrevivência ultrapassa os 60% (POPMA; GREEN, 1990; MARENGONI, 1999; KUBITZA, 2000). No presente estudo, a sobrevivência após a fase de reversão sexual foi bastante elevada, com taxas de 91,78% no T1, 92,71% no T2, 93,95% no T3 e 93,23% no T4.

Como é possível observar, as taxas de mortalidade acumulada obtidas neste experimento, além de não apresentarem diferenças estatisticamente significativas, foram até mesmo mais baixas do que as verificadas em outros trabalhos com reversão sexual.

No entanto, quando a mortalidade foi avaliada semanalmente (Figura 6) observou-se que, durante as três primeiras semanas de reversão sexual, todos os tratamentos apresentaram uma mortalidade semelhante, não sendo significativamente diferente ao nível de 5%, embora o tratamento T3 já

apresente uma menor tendência na 3ª semana de reversão, durante a situação de pouco estresse (estresse\*). Porém, durante a última semana de reversão sexual, após a criação da situação de estresse moderado (estresse\*\*), os tratamentos onde foram utilizados 0,1 e 0,2mg de polissacarídeo sulfatado por grama de peso vivo das pós-larvas (T3 e T4) apresentaram uma mortalidade significativamente menor ( $\alpha = 0,05$ ) com relação aos demais tratamentos.

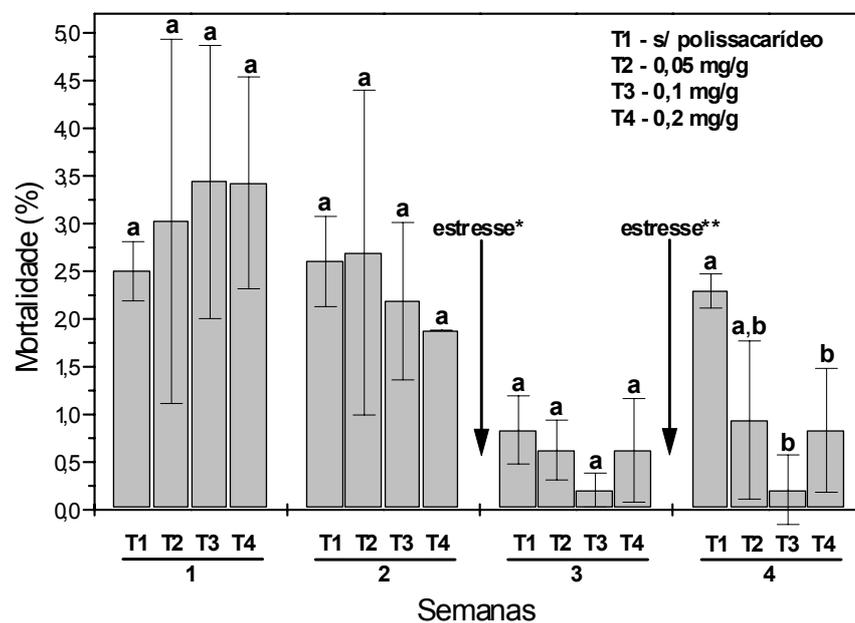


Figura 6. Mortalidade semanal dos peixes, por tratamento, durante a fase de reversão sexual. Letras diferentes sobre as barras de erro indicam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5%. \* = pouco estresse; \*\* = estresse moderado.

A Figura 7 mostra a mortalidade das pós-larvas durante a última semana da fase de reversão sexual (estresse moderado) e após cinco dias do final da reversão sexual, quando foi estabelecida a situação de estresse elevado (estresse\*\*\*).

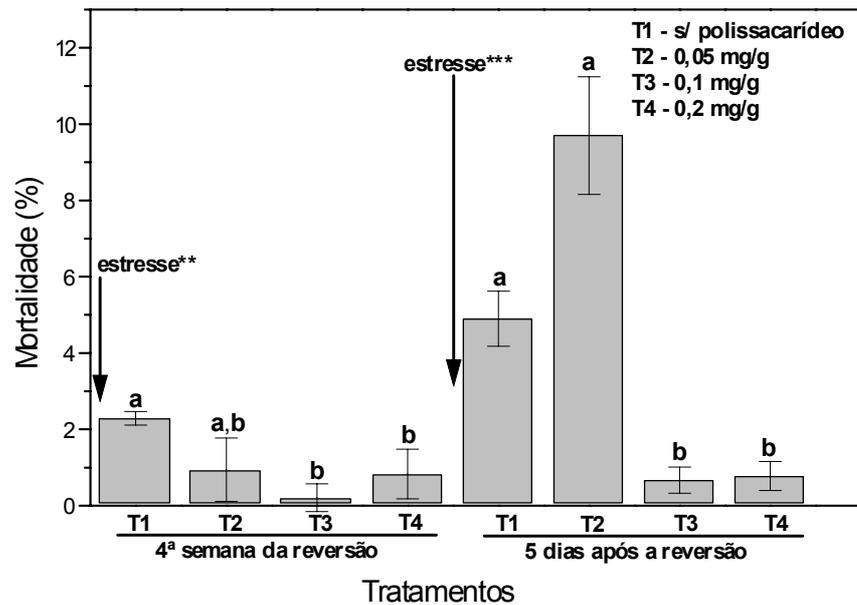


Figura 7. Mortalidade das pós-larvas de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, em todos os tratamentos, durante a última semana de reversão sexual e após cinco dias de estresse. Letras diferentes sobre as barras de erro indicam diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% (estresse\*\*) ou ao nível de 1% (estresse\*\*\*). \*\* = estresse moderado; \*\*\* = estresse elevado.

Como comentado anteriormente, durante a última semana da fase de reversão sexual, os tratamentos T3 e T4 já apresentavam uma mortalidade significativamente menor ( $\alpha = 0,05$ ) do que os demais tratamentos e, quando o nível de estresse foi intensificado durante cinco dias, os mesmos tratamentos continuaram apresentando mortalidades significativamente menores ( $\alpha = 0,01$ ) do que os tratamentos T1 (controle) e T2. Além disso, a mortalidade nos tratamentos T1 e T2 aumentaram bastante em relação à verificada na última semana de reversão (Figura 7). Assim, os peixes que receberam a menor dose do polissacarídeo sulfatado (T2) e os que não receberam (T1) foram muito

mais susceptíveis à mortalidade induzida pelo estresse causado pela baixa qualidade da água (sem renovação) e ausência de aeração durante os últimos 5 dias do experimento.

Desta forma, as pós-larvas que receberam as dosagens de 0,1 e 0,2mg/g de peso (T3 e T4) se mostraram mais resistentes à situação de estresse elevado induzida no final do experimento.

Esses resultados indicam que o efeito da adição do polissacarídeo sulfatado da alga marinha *G. caudata*, reduzindo a mortalidade, varia de acordo com a dosagem administrada. De acordo com SAKAI (1999), o efeito dos imunostimulantes é diretamente dependente de uma dose ideal, pois altas doses podem não melhorar e até mesmo serem inibidoras da resposta imunológica.

Vários trabalhos mostraram que a administração de imunostimulantes em peixes pode melhorar a sobrevivência quando os indivíduos foram submetidos a infecções.

JENEY; ANDERSON (1993) relataram que trutas arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, imersas em solução contendo o imunostimulante levamisol e submetidas à infecção com *Aeromonas salmonicida*, apresentaram menores taxas de mortalidade quando comparadas com o controle sem o imunostimulante.

ROBERTSEN et al. (1990) relataram um aumento das defesas não específicas no salmão do Atlântico, *Salmo salar*, após a administração de glucanos obtidos da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O melhor efeito foi obtido nas doses de 0,1 a 1µg/mL, enquanto a dose de 10µg/mL não surtiu nenhum efeito e a dose de 50µg/mL apresentou um efeito

inibitório. Os resultados alcançados pelos autores foram semelhantes aos obtidos em nosso experimento. A dose intermediária apresentou um melhor efeito, o que também foi verificado no presente estudo.

PARK; JEONG (1996) observaram um aumento significativo na sobrevivência de juvenis de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, infectados por *Edwardsiella tarda* quando alimentados com ração suplementada com um polissacarídeo isolado de *Coriolus versicolor* na dose de 0,1mg/g. Os autores ainda relataram que o aumento da dose para 0,9mg/g não resultou em uma maior resistência ao patógeno. A administração de uma dose intermediária de polissacarídeo também foi verificada em nosso estudo quando obtivemos o melhor efeito imunoestimulante, o mesmo ocorreu no trabalho descrito.

TINMAN et al. (2000) avaliaram a sobrevivência de híbridos de tilápia (*O. aureus* x *O. niloticus*), infectados com *Streptococcus difficile* e alimentados por mais de dois meses com ração suplementada com peptídeo glucano. Os autores utilizaram uma dose alta de 140mg/kg, uma dose baixa de 70mg/kg e um grupo controle sem o polissacarídeo. De acordo com os autores, apenas os peixes tratados com a dose baixa apresentaram uma melhor sobrevivência devido a um aumento das defesas não específicas. A menor dosagem do polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* utilizado em nosso experimento não resultou em um melhor efeito, pois a sobrevivência dos peixes, durante a fase de reversão sexual, foi menor no tratamento onde utilizamos a dosagem de 0,05mg/g do mesmo na ração (dose mais baixa), sendo este resultado o mais baixo comparado as demais dosagens verificadas.

ESTEBAN et al. (2001) determinaram os efeitos do polissacarídeo quitina na resposta imune do peixe *Sparus aurata*. Os peixes foram

alimentados com dietas que continham 0 (controle), 25, 50 e 100mg de quitina por kg, por 2, 4, e 6 semanas. Os autores constataram que a administração de quitina na dieta aumentou a atividade do sistema imunológico dos peixes com relação às respostas humoral e celulares. O efeito do polissacarídeo quitina descrito acima apresentou um efeito positivo na resposta imune do peixe *Spaurus aurata* em todos os tratamentos, o que também foi verificado em nosso estudo, sendo a dosagem de 0,1mg/g de peso vivo das pós-larvas apresentou melhor efeito.

COUSO et al. (2003) mostraram que a administração oral de glucanos em peixes, *Spaurus aurata*, submetidos à infecção por *Photobacterium damsale*, diminuiu as taxas de mortalidade. Segundo os autores a concentração do polissacarídeo e o tempo de administração são bastante importantes para se obter uma melhor proteção contra a doença. Essas mesmas características foram verificadas em nosso estudo, onde foi necessária uma dose ideal (intermediária) para a dieta dos peixes, sendo a concentração e o tempo de administração, fatores essenciais para o resultado encontrado.

BAGNI et al. (2005) demonstraram que o ácido algínico (ergosam), um polissacarídeo derivado de várias macro e microalgas pardas, e glucanos ( $\beta$ -glucano) administrados oralmente a peixes *Dicentrarchus labrax*, exibiram um efeito ativador, significativo, no sistema imune não específico, particularmente em condições ambientais adversas, o qual durou até 15 dias após o fim do experimento. O efeito imunoestimulante do ergosam já havia sido reportado anteriormente por MILES et al. (2001) através de injeção intraperitoneal em

peixes *Channa striata*, quando foi verificado um aumento na atividade fagocitária e na capacidade de inibição do fungo *Aphanomyces invadans*.

CASTRO et al. (2003) utilizaram extratos aquosos das algas marinhas *Ulva rigida*, *Enteromorpha* sp., *Codium tomentosum*, *Fucus vesiculosus*, *Pelvetia canaliculata*, *Dictyota dichotoma*, *Chondrus crispus* e *Porphyra umbilicalis* com o intuito de obter imunostimulantes. As melhores respostas foram encontradas nos extratos obtidos das algas *U. rigida*, *Enteromorpha* sp. e *C. crispus*. As frações contendo os polissacarídeos sulfatados de *U. rigida* e de *C. crispus* induziram um aumento da atividade respiratória dos fagócitos.

Recentemente, foi demonstrado que a administração oral dos imunostimulantes levamisol, quitosana e quitina em carpas comuns, *C. carpio*, aumentaram significativamente a sobrevivência dos animais após infecção com *Aeromonas hydrophila*. O melhor resultado foi obtido com o polissacarídeo quitosana, o qual aumentou a sobrevivência dos peixes em 80 e 68,9% após 45 e 90 dias de infecção, respectivamente. Além disso, a administração dos imunostimulantes também resultou em um maior ganho de peso dos animais (GOPALAKANNAN; ARUL, 2006). A administração de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* apresentou uma maior sobrevivência de larvas de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, verificado no presente experimento. O mesmo não ocorreu com os pesos médios finais e ganhos médios de pesos diários dos peixes.

A utilização de imunostimulantes em camarões também tem resultado em um aumento das taxas de sobrevivência.

ITAMI et al. (1998) mostraram que a administração oral, durante 65 dias, de um peptídeo glucano derivado da bactéria *Bifidobacterium thermophilum* a

camarões *Penaeus monodon*, infectados com *Vibrium penaeicida*, resultou em um aumento significativo da sobrevivência (63,4%) quando comparado ao controle (25%). Além disso, quando o tempo de administração foi aumentado para 95 dias, a sobrevivência dos animais que receberam o polissacarídeo passou a ser de 81,7%, enquanto a do grupo controle ficou em 20%. Nesse estudo, os autores utilizaram uma dieta de 0,2mg/kg de peso/dia, durante 7 dias consecutivos, alternando com 7 dias sem sua utilização. O tempo de administração do polissacarídeo sulfatado em nosso estudo também foi fundamental para a determinação da dosagem ideal, já que durante a quarta semana de reversão, nos tratamentos onde utilizamos 0,1 e 0,2mg/g de peso vivo dos peixes já apresentavam diferença significativa comparado aos demais tratamentos. Os cinco dias após a fase de reversão sexual, nas mesmas dosagens, nos indicaram o efeito positivo do mesmo.

TAKAHASHI et al. (1998) mostraram uma redução na mortalidade de camarões *P. japonicus*, infectados pelo vírus causador da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), após a administração de dietas contendo um fucoídano extraído da alga parda *Cladosiphon okamuranus*. O fucoídano é um polissacarídeo rico em fucose sulfatada. A complexidade das fucanas sulfatadas varia com a espécie da alga e, provavelmente, com as técnicas utilizadas na extração (McCANDLESS; CRAIGIE, 1979).

CHANG et al. (2000) mostraram que a utilização de dietas contendo 2g de  $\beta$ -1,3-glucano/kg de ração resultou em um aumento na sobrevivência de camarões *P. monodon*, cultivados em sistemas "indoor" e "outdoor". As médias de sobrevivência para os organismos que não receberam o polissacarídeo na ração foram de 35 e 25% para os sistemas "indoor" e "outdoor",

respectivamente. Por outro lado, os animais que receberam o polissacarídeo na dieta, no sistema "indoor", apresentaram uma sobrevivência média de 71,7%, enquanto que no sistema "outdoor" a sobrevivência foi de 70%. O mesmo fato foi verificado em nosso experimento, onde as dosagens onde utilizamos polissacarídeos sulfatados apresentaram uma maior sobrevivência das larvas.

A administração da microalga cianofícea *S. platensis* na concentração de 0,3% na dieta de camarões *P. merguensis*, resultou em um aumento significativo na sobrevivência quando os animais foram submetidos à infecção por *Vibrio harveyi*. Apenas 10% dos camarões alimentados com a microalga morreram após 14 dias de infecção, enquanto que todos os animais do controle (sem a microalga) morreram no mesmo período (LEE et al., 2003).

CHOTIGEAT et al. (2004) demonstraram que a administração oral de um fucoidam extraído da alga marinha parda *Sargassum polycystum*, no camarão *P. monodon*, aumentou a taxa de sobrevivência dos animais quando os mesmos foram submetidos à infecção pelo WSSV. Após 10 dias de infecção, as taxas máximas de sobrevivência dos camarões de 5-8 e de 12-15g foram de 46 e 93%, respectivamente. A fucoidana também foi capaz de inibir o crescimento do *Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* nas concentrações de 12,0, 12,0 e 6,0mg/mL, respectivamente. A administração do polissacarídeo sulfatado na dieta dos peixes durante nosso estudo, fez com que o estresse dos animais fosse inibido, em todas as dosagens verificadas. Os patógenos naturais, presentes nas repetições, não apresentaram elevado efeito comparado com o controle, onde não foi utilizado o polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* na ração das larvas.

Assim, foi verificado um efeito positivo no sistema imunológico dos peixes ao se administrar durante a fase de reversão sexual.

Recentemente, a administração na dieta de camarões, *Fenneropenaeus chinensis*, de um extrato bruto de polissacarídeos obtido da alga marinha parda *Sargassum fusiforme* aumentou a sobrevivência dos animais após a infecção por *V. harveyi*. Os camarões foram alimentados com dietas contendo 0, 0,5, 1,0 e 2,0% de polissacarídeos e os resultados mostraram que aqueles que receberam o polissacarídeo nas concentrações de 0,5 e 1,0% apresentaram uma sobrevivência significativamente maior do que o controle após 30 e 24h da infecção, respectivamente. Por outro lado, os animais que receberam a maior dose de polissacarídeo (2,0%) não apresentaram o mesmo efeito (HUANG et al., 2006). A administração de uma dose intermediária de polissacarídeo sulfatado também foi verificada em nosso estudo quando obtivemos o melhor efeito imunoestimulante, o mesmo ocorreu no trabalho descrito. A maior dosagem do polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* utilizado em nosso experimento não resultou em um melhor efeito.

Alguns imunoestimulantes também têm sido efetivos quando administrados dissolvidos na água de cultivo de camarões.

CAMPA-CÓRDOVA et al. (2002) mostraram que a imersão de juvenis do camarão *L. vannamei*, durante 6 horas, em soluções contendo polissacarídeos aumentou a produção do ânion superóxido e a atividade da enzima superóxido dismutase, indicando um efeito imunoestimulante. Os autores testaram dois polissacarídeos, sendo um não sulfatado ( $\beta$ -glucano) e um polissacarídeo sulfatado extraído de uma microalga cianofícea. Este efeito foi 2 e 1,4 vezes maior do que o observado nos controles, quando os animais foram imersos em

soluções de  $\beta$ -glucano e polissacarídeo sulfatado, respectivamente. No entanto, a dose do polissacarídeo sulfatado foi cerca de 500 vezes menor do que a utilizada com o polissacarídeo não sulfatado. Quando os polissacarídeos sulfatados de *B. occidentalis* foram utilizados em pós-larvas do camarão *L. vannamei*, submetidas ao estresse, na forma de banhos de imersão foi observada uma maior sobrevivência em uma determinada dose, não sendo observado o mesmo efeito com o aumento da dose (BARROSO, 2005).

Como é possível observar, existe uma forte relação entre a imunoestimulação e o aumento da resistência a infecções causadas por bactérias e vírus ou em situações estressantes, tanto em peixes como em camarões (SAKAI, 1999).

#### **4.5. Parâmetros físico-químicos da água**

Os parâmetros oxigênio dissolvido, temperatura e pH da água foram determinados durante as diferentes situações de estresse criadas no experimento. Desta forma, foram realizadas 4 determinações, sendo a primeira na 2ª semana de reversão sexual, quando não existia nenhum tipo de estresse no experimento, a segunda na 3ª semana de reversão, quando foi estabelecida a situação de pouco estresse (estresse\*), a terceira na 4ª semana de reversão, quando foi criada a situação de estresse moderado (estresse\*\*) e a quarta determinação que foi realizada quando a situação de estresse elevado foi estabelecida (estresse\*\*\*), durante 5 dias após a reversão sexual.

Os parâmetros supracitados não variaram muito dentro das diferentes situações de estresse (Tabela 8). Após a retirada da aeração diurna, o nível de

oxigênio dissolvido sofreu uma queda brusca, caindo de  $4,73\pm 0,13$ mg/L (sem estresse) para  $0,32\pm 0,07$ mg/L (pouco estresse). Esse baixo nível de oxigênio dissolvido permaneceu praticamente o mesmo nas outras situações de estresse. Com relação à mortalidade, é possível observar que ela diminuiu quando se passou da situação sem estresse (9,35%) para a de pouco estresse (2,27%), mostrando a alta resistência das pós-larvas de tilápias à ausência de aeração diurna. Somente após o estabelecimento da situação de estresse moderado é que foi observado um aumento na mortalidade total das pós-larvas (4,27%), atingindo um máximo de 16,05% durante a situação de estresse elevado. Na realidade, apesar dos valores de oxigênio dissolvido serem praticamente os mesmos, a ausência de renovação da água na situação de estresse elevado foi a responsável pela alta mortalidade no experimento. Esse fato foi comprovado pelo forte odor exalado de todos os aquários utilizados no experimento.

Tabela 8. Médias e desvios padrões das concentrações de oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura (°C) e pH da água de cultivo, e mortalidade total das pós-larvas, em todos os tratamentos, nas várias situações de estresse criadas durante o experimento.

Situações	O <sub>2</sub> D (mg/L)	Temperatura (°C)	pH	Mortalidade Total (%)
Sem estresse	$4,73\pm 0,13$	$26,9\pm 0,35$	$7,98\pm 0,21$	9,35
Pouco estresse	$0,32\pm 0,07$	$26,9\pm 0,26$	$7,71\pm 0,08$	2,27
Estresse moderado	$0,30\pm 0,03$	$25,4\pm 0,24$	$8,44\pm 0,13$	4,27
Estresse elevado	$0,30\pm 0,13$	$25,6\pm 0,24$	$8,14\pm 0,09$	16,05

#### 4.6. Transporte das pós-larvas

A sobrevivência das pós-larvas durante o transporte variou de 100% no tratamento T3 a 97,67% no T2 (Tabela 9).

Tabela 9. Sobrevivência dos alevinos de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, após o transporte.

Tratamentos	Sobrevivência das pós-larvas (%)
T1	98,00
T2	97,67
T3	100,00
T4	99,33

Ao final do transporte dos peixes, a maior sobrevivência (100%) ocorreu no tratamento onde foi utilizada a dosagem de 0,1mg/g de peso vivo das larvas na ração (T3), seguido do tratamento T4 no qual foi utilizada a dose de 0,2 mg/g (99,33%), sendo a menor sobrevivência observada no tratamento onde foi utilizada a dosagem de 0,05mg/g de peso vivo das larvas na ração (T2). Apesar de não ter sido realizada uma análise estatística, devido à ausência de repetições no transporte, esses dados corroboram a eficiência dos tratamentos T3 e T4 em conferir uma maior resistência aos peixes submetidos a situações de estresse.

JENEY et al. (2004) avaliaram os efeitos do estresse nos mecanismos de defesa não específica da truta arco-íris, *O. mykiss*, alimentadas com dietas contendo diferentes doses de glucano. Os peixes foram alimentados com 0,

0,5 e 1,0% de glucano. Após 4 semanas de alimentação, os peixes foram estressados através de um transporte de 2 horas. Os efeitos do estresse foram verificados através de mudanças nos níveis de cortisol no sangue, glicose, proteína total e composição da população de leucócitos. Após o transporte, o estresse causou elevação dos níveis de cortisol no plasma e hiperglicemia em todos os tratamentos, mas os níveis mais elevados de glicose foram verificados no tratamento que continha 1,0% de glucano.

Outros experimentos devem ser realizados para avaliar melhor o efeito imunoestimulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *G. caudata* em tilápias, principalmente com relação aos teores de cortisol, glicose e proteína total do plasma, bem como a contagem de leucócitos.

## 5. CONCLUSÕES

Após a realização do presente trabalho, é possível concluir que a incorporação da dosagem de 0,1mg/g de polissacarídeo sulfatado, extraído da macroalga marinha vermelha *G. caudata*, na ração de tilápias submetidas à reversão sexual foi capaz de conferir uma maior resistência aos peixes, quando eles foram submetidos às condições de estresse. Além disso, ao dobrar a concentração do polissacarídeo sulfatado na dieta, não resultou em um maior efeito na sobrevivência dos peixes, indicando uma ausência de dose-dependência, pois o melhor efeito imunestimulante do mesmo não depende do aumento da dosagem. Por fim, podemos concluir que os dados apresentados foram os melhores encontrados com relação ao efeito imunestimulante de polissacarídeos extraídos de algas marinhas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, G. S.; FARIAS, W. R. L. Cultivo e extração de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata*. **Anais do XIII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura – XIII SIMBRAq**. Fortaleza, CE. v. 1, p. 31-41, Agosto, 2004.
- BACHÈRE, E. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. **Aquaculture**. v. 227, p. 427-438, 2003.
- BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIA, M. G.; ABELLI, L.; SCAPIGLIATI, G.; TISCAR, P. G.; SARTI, M.; MARINO, G. Short- and long-term effects of a dietary yeast  $\beta$ -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish & Shellfish Immunology**. v. 18, n. 4, p. 311-325, 2005.
- BARROSO, F. E. C. O. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* (Rhodophyta, Rhodymeniales) na sobrevivência de pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*, adaptadas em águas oligohalinas. **Dissertação de Mestrado do Curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará**, 2005.
- BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F.; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C.; FISCHER, A. M.; de AGOSTINI, A. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs of the future**. v. 20, n. 12, p. 1237-1249, 1995.
- BORGES, A. M.; MORETTI, J.; COSTA, O.; McMANUS, C.; MARIANTE, A. S. Produção de populações monossexo macho de tilápia do Nilo da linhagem Chitralada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v. 40, n. 2, p. 153-159, 2005.
- BORGHETTI, J. R.; OSTRENSKY, A. Estratégia e ações governamentais para incentivar o crescimento da atividade aquícola no Brasil. **Simpósio Brasileiro de Aqüicultura**. Associação dos Engenheiros de Pesca de Pernambuco. Recife, v. 1, p. 437-447, 1998.
- BRICKNELL, I., DALMO, R. A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish e shellfish imunology**,...2005.
- BROWDY, C. L. Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 164, p. 3-21, 1998.

- BULLOCK, G.; BLAZER, V.; TSUKUDA, S.; SUMMERFELT, S. Toxicity of acidified chitosan for cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**. Amsterdam, v. 185, p. 273-280, 2000.
- CAMPA-CÓRDOVA, A. I.; HERNANDEZ-SAAVEDRA, N. Y.; PHILIPPIS, R.; ASCENCIO, F. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulfated polysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 12, p. 353-366, 2002.
- CASTRO, R.; ZARRA, I.; LAMAS, J. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. **Aquaculture**. Amsterdam, 2003.
- CHANG, C.; CHEN, H.; SU, M.; LIAO, I. Immunomodulation by dietary  $\beta$ -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish & shellfish immunology**. v. 10, p. 505-514, 2000.
- COHEN, S. M. A critical review of the toxicological effects of carrageenan and processed eucheuma seaweed of the gastrointestinal tract. **Critical reviews in toxicology**. v. 32, n. 5, p. 413-444, 2002.
- COSTA, F. H. F.; FARIAS, W. R. L.; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPAIO, S.; ROCHA, I. R. C. B.; PONTES, G. da C.; SILVA, C. M.; SILVA-NETO, J. F.; DA SILVA, F. L. S.; NUNES, E. V.; DE SOUZA, A. L. F.; LIMA-JUNIOR, T. B. Enhancement of disease resistance against infectious myonecrosis virus (IMNV) of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* by sulfated polysaccharide extracts from the red seaweeds *Botryocladia occidentalis* and *Solieria filiformis*. **III Simpósio Internacional sobre a indústria do camarão cultivado**. Natal, RN. Março, 2006.
- CHOTIGEAT, W.; TONGSUPAB, S.; SUPAMATAYAC, K.; PHONGDARA, A. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 233, p. 23-30, 2004.
- COUSO, N.; CASTRO, R.; MAGARIÑOS, B.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 219, n. 1-4, p. 99-109, 2003.
- CROSS, G. G.; JENNINGS, H. J.; WHITFIELD, D. M.; PENNEY, C. L.; ZACHARIE, B.; GAGNON, L. Immunostimulant oxidized  $\beta$ -glucan conjugates. **International Immunopharmacology**. v. 1, p. 539-550, 2001.

- ESPINOSA, G.; RODRÍGUEZ-RAMOS, T.; MARRERO, J.; RAMOS, L.; BORRELL, Y.; BÉCQUER, U.; NODAS, F.; HERNÁNDEZ, N. D. Efectores imunitarios como herramientas em la prevención de enfermedades em él camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **CIVA**. p. 765-777. 2002.
- ESTEBAN, M. A.; CUESTA, A.; ORTUÑO, J.; MESEGUER, J. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 11, p. 303-315, 2001.
- FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2002. **FAO**. Rome, Italy. 150p, 2002.
- FAO. Fishery Information, Data and Statistics Unit. **FAO Yearbook of Fishery Statistics. Fisheries and Aquaculture** - General aspects. v. 96/1, p. 38, 42-44, 2005.
- FARIAS, W. R. L. Estrutura e atividades anticoagulante e antitrombótica de galactanas sulfatadas da alga *Botryocladia occidentalis*. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** – Departamento de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 173p, 2000.
- FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n. 88, p. 29299 a 29307, 2000.
- FARIAS, W. R. L.; NAZARETH, R. A.; MOURÃO, P. A. S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 86, p. 1540 – 1546, 2001.
- FARIAS, W. R. L.; REBOUÇAS, H. J.; TORRES, V. M.; RODRIGUES, J. A. G.; PONTES, G. C.; SILVA, F. H. O. S.; SAMPAIO, A. H. Enhancement of growth in tilapia larvae (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from the red marine alga *Botryocladia occidentalis*. **Revista Ciência Agronômica**. Fortaleza, CE. v. 35, Número Especial, p. 189 – 195, 2004.
- FITZSIMMONS, K. Future trends of tilapia Aquaculture in the Américas, 252-264. In: B.A.Costa-Pierce and J.E.Rakocy (Eds.). **Tilapia Aquaculture in Americas**. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, United States. v. 2, 264 pp, 2000.

- GOPALAKANNAN, A; ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 255, p. 179-187, 2006.
- GUERRERO, R. D.; GUERRERO, L. A. Feasibility of commercial production of Nile tilapia fingerlings in Philippines. **International Symposium on Tilapia Aquaculture**. Manila Philippines, *Conference Proceedings...* Manila Philippines: Department of Fisheries, Bangkok, Thailand, and International Center for Living Aquatic Resources Management. v. 2, p. 183-186, 1988.
- HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; KOJIMA, I. A. Natural sulfated polysaccharide, calcium spirulam, isolated from *Spirulina platensis*: *in vitro* and *ex vivo* evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. **Aids Research and Human Retroviruses**, v. 12, n. 15, p. 1463-1471, 1996.
- HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SOARES, C. M.; MEURER, F. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 31, n. 2, p. 823-828, 2002.
- HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. Activation of the human innate system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. **International Immunopharmacology**. v. 2, p. 423-434, 2002.
- HUANG, X.; ZHOU, H.; ZHANG, H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish e Shellfish Immunology**. v. 20, p. 750-757, 2006.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da Pesca** – Produção brasileira da aquicultura e pesca, por Estado e por espécie, para o ano de 2004. Brasília-DF, 2005.
- ITAMI, T.; ASANO, M.; TOKUSHIGE, K.; KUBONO, K.; NAKAGAWA, A.; TAKENO, N.; NISHIMURA, H.; MAEDA, M.; KONDO, M.; TAKAHASHI, Y. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium termophilum*. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 164, p. 277-288, 1998.
- JENEY, G.; ANDERSON, D. P. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 3, p. 51-58, 1993.

- JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D. P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 154, p. 1-15, 2004.
- KAWAKAMI, H.; SHINOHARA, N.; SAKAI, M. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin or Freund's complete adjuvant in yellowtail *Seriola quinqueradiata* to *Pasteurella piscicida* infection. **Fish Pathol.** v. 33, p. 287-292, 1998.
- KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Fernando Kubitza. Jundiaí, SP: F. Kubitza. p. 7; 19 e 20; 23 a 27; 33 e 140 – 141, 2000.
- KUBITZA, F. Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões. Fernando Kubitza. Jundiaí, SP: F. Kubitza. p. 29 a 31; 33 e 34; 43; 49 e 50, 2003.
- LEE, Y.; CHEW, P.; SOH, B.; THAM, L. Y. Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus merguensis* by feeding *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**. v. 15, p. 279-287, 2003.
- LOVSHIN, L.L. Tilapia culture in Brazil. In: Costa-Pierce, B.A.; Rakocy, J.E. Tilapia aquaculture in the Americas. Louisiana, U.S: **The World Aquaculture Society**. Baton Rouge. p. 133-140, 2000.
- McCANDLES, E. L.; CRAIGIE, J. S. Sulfated polysaccharides in red and brown algae. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 30, p. 41-53, 1979.
- MAINARDES-PINTO, C. S. R.; FENERICH-VERANI, N.; CAMPOS, B. E. S.; SILVA, A. L. Masculinização de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17- $\alpha$ -metilttestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 29, n. 3, p. 654-659, 2000.
- MARENGONI, N. G. Curso de formação em piscicultura; 2<sup>o</sup>. São Paulo: **Universidade do Oeste Paulista**. Módulo 6: Reversão sexual e cultivo de tilápia, 1999.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SCHAMBER, C. R.; BOMBARDELLI, R. A. Fontes protéicas suplementadas com aminoácidos e minerais para tilápia do Nilo durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 34, n. 1, p.1-6, 2005.
- MILES, D. J. C.; POLCHANA, J.; LILLEY, J. H.; KANCHANAKHAN, S.; THOMPSON, K. D.; ADAMS, A. Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. **Aquaculture**. Amsterdam. v. 195, n. 1, p. 1-15, 2001.

- MOULLAC, G. L., HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 191, p. 121-131, 2000.
- NANDEESHA, M. C.; GANGADHARA, B.; MANISSERY, J. K.; VENKATAMARAN, L. V. Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**. v. 80, p. 117-120, 2001.
- PARK, H.H.; JEONG, H.D. Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* in tilapia (*O. niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharidae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 143, n. 3, p. 135-143, 1996.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. **Academic Press**, ED., N. Y. 1967.
- PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. Sex reversal of tilapia. In: Costa-Pierce, B.A.; Rakocy, J.E. **Tilapia Aquaculture in the Americas**. Louisiana, U.S.: The World Aquaculture Society, Baton Rouge. v. 2, n. 264, p. 34-59, 2000.
- POPMA, T. J.; GREEN, B. W. Manual de produccion acuicola: reversion sexual de tilapia em lagunas de tierra. Auburn: **Asociación Americana de Soya**. 35 p, 1990.
- REBOUÇAS, H. J.; TORRES, V. M.; PONTES, G. C.; SILVA, F. H. O.; RODRIGUES, J. A. G.; NETO, J. T. B. B.; FARIAS, W. R. L. Efeito da adição do polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Botryocladia occidentalis* na ração de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, submetidos à reversão sexual. **XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura**. Goiânia/GO. p. 002, 2002.
- RIBEIRO, R. P. Curso de atualização em piscicultura de água doce. **Universidade do Oeste Paulista**. Módulo: 5: Criação de espécies exóticas, p. 21-43, 1998.
- RIVERA, G.; YOONG, F.; RIOFRÍO, G.; REINOSO, B.; HURTADO, F.; MASSUH, P. Inclusión de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos balanceados para camarón. **CIVA**. p. 244-252, 2002.
- ROBERTSEN, B.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **J. Fish Dis**. v. 13, p. 391-400, 1990.
- SAKAI, M. Current reserarch status of fish imunoestulants. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 172, n. 1, p. 63-92, 1999.

- SANTOS, A. J. G; SILVA, L. N. Biotecnologia em Aqüicultura – Processos, riscos e cuidados. Ênfase à produção de tilápias. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro. v. 8. n. 45, p. 22-26, 1998.
- SCOTT, A. G.; PENMAN, D. J.; BEARDMORE, J. A.; SKIBINSKI, D. O.F. The YY supermale in *Oreochromis niloticus* (L) and its potencial in aquaculture. **Aquaculture**. Amesterdam. v. 3, n. 78, p. 237-251, 1989.
- TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; VALLE, J. B.; SIQUEIRA, M. R. Desempenho de diferentes linhagens de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá. v. 26, n. 3, p. 305-311, 2004.
- TAKAHASHI, Y.; UEHARA, K.; WATANABE, R.; OKUMURA, T.; YAMASHITA, T.; OMURA, H.; YOMO, T.; KANEMITSU, A.; KAWANO, T.; NARASAKA, H.; SUZUKI, N.; ITAMI, T. Efficacy of oral administration shrimp in Japan. Flegel, T.W. (Ed.), **Advances in Shrimp Biotechnology**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, p. 171–173, 1998.
- TAVE, D. Genetics and breeding of tilapia: a review. International Symposium on Tilapia in Aquaculture, 2<sup>th</sup>. Bangkok Proceedings...Bangok: **International Center for Living Aquatic Resouces Manegement**. p. 285-293, 1988.
- TINMAN, S.; KELVIN, F.; CARVALHO-FILHO, J. Effect of long-term oral administration of peptidoglucan (PG- Ajinomoto product) on growth rate and imunoestimulation response of hybrid tilapia (*O. aureus* X *O. niloticus*). **International Symposium on Tilapia Aquaculture**, 5<sup>th</sup>. Rio de Janeiro. Proceedings... Rio de Janeiro. v. 2, p. 524-532, 2000.
- VADSTEIN, O.; OIE, G.; OLSEN, Y.; SALVESEN, I.; SKJERMO, J.; SKJAK-BRAEK, G. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. REINERTSEN, H. *et al.* (Eds) **Fish Farming Technology**. Bakema Publishers. p. 69-75, 1993.
- WATANUKI, H.; WATANUKI, H.; OTA, K. MALINA, A. C.; TASSAKKA, A. R.; TAKO, T.; SAKAI, M. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, 2006.