



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

RENATO TEIXEIRA MOREIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA
MICROALGA *Dunaliella tertiolecta* COMO IMUNOESTIMULANTE EM JUVENIS DE
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

FORTALEZA - CEARÁ
AGOSTO / 2010

RENATO TEIXEIRA MOREIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA
MICROALGA *Dunaliella tertiolecta* COMO IMUNOESTIMULANTE EM JUVENIS DE
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PESCA.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias

FORTALEZA - CEARÁ
AGOSTO / 2010

RENATO TEIXEIRA MOREIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA
MICROALGA *Dunaliella tertiolecta* COMO IMUNOESTIMULANTE EM JUVENIS DE
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

Esta dissertação foi submetida à coordenação do programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca 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 da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

RENATO TEIXEIRA MOREIRA

APROVADA EM ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. WLADIMIR RONALD LOBO FARIAS (ORIENTADOR)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ-UFC

PROF. DR. CELSO SHINITI NAGANO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ-UFC

PROF. DRA. LUCIANE MARIA PERAZZOLO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA-UFSC

À minha filha, LOURDES MARIA,
por tudo que você representa para mim,
e pelo seu amor incondicional.
Te Amo!

“O SENHOR é o meu pastor: nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas. Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome.” Salmo 23, versículos 1-3.

“Julga-me, SENHOR, pois tenho andado em minha sinceridade; tenho confiado também no SENHOR; não vacilarei. Examina-me, SENHOR, e prova-me: esquadrinha os meus rins e o meu coração.” Salmo 26, versículos 1-2.

“O SENHOR é a minha luz e a minha salvação; a quem temerei? O SENHOR é a força da minha vida; de quem me recearei?” Salmo 27, versículo 1.

“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará. Direi SENHOR: Ele é o meu DEUS, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei” Salmo 91, versículos 1-2.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por todas as coisas maravilhosas que tem realizado em minha vida e por me conduzir em seus braços.

A minha esposa Sarah, pelo amor, apoio, incentivo, dedicação e companheirismo ao longo de todos estes anos juntos. TE AMO!

Aos meus pais, Amílcar e Rita e aos meus sogros, Mauro e Ivanilce, por tudo que me proporcionaram ao longo de toda a minha jornada acadêmica, sempre suprimindo a minha ausência. Amo vocês também!

Ao meu cunhado, Pedro Mauro e aos meus irmãos Amílcar Jr. e Eduardo pelo grande incentivo.

Ao Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias, pela orientação, pelos ensinamentos, lições, compreensão, apoio e incentivo, mas, sobretudo pela concretização de minha vida acadêmica.

A Profa. Dra. Luciane Maria Perazzolo, pela atenção, disposição, incentivo e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano pela sua valiosa contribuição.

A todos os professores do Departamento de Engenharia de Pesca, pelos ensinamentos, apoio e amizade.

A todos os amigos dessa longa caminhada de Graduação e Pós-Graduação, em especial ao Gabriel Teixeira e Luís Paulo pelo incentivo, mas fundamentalmente pela ajuda na concretização deste trabalho, ao Farley, Glacio, Rafael Viana, Jefferson, William e Alan, pelo incentivo, mas também pela amizade, valeu!

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

E a todos que não mencionei, mas contribuíram para minha formação, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Produção de microalgas	18
2.2 Polissacarídeos sulfatados de algas	22
2.3 Substâncias poliméricas extracelulares (EPS)	25
2.4 A atividade imunoestimulante dos polissacarídeos sulfatados	27
2.5 O sistema imune dos crustáceos	29
2.6 As microalgas do gênero <i>Dunaliella</i>	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Obtenção e cultivo das microalgas	33
3.2 Quantificação da biomassa	33
3.3 Coleta da biomassa	34
3.4 Extração de polissacarídeos sulfatados	34
3.5 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados de <i>D. tertiolecta</i>	35
3.6 Animais e desenho experimental	36
3.6.1 Teste de estresse salino para pós-larvas	36
3.7 Coleta da hemolinfa e análise de imunoparâmetros	37
3.7.1 Contagem total de hemócitos (CTH)	37
3.7.2 Atividade da fenoloxidase (PO)	38
3.7.3 Concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP)	38
3.7.4 valiação da capacidade aglutinante da hemolinfa	38
3.8 Análises estatísticas	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Cultivos e parâmetros de desenvolvimento da microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	40
4.2 Extração dos polissacarídeos sulfatados	41
4.3 Fracionamento dos Polissacarídeos sulfatados	42
4.4 Teste de estresse salino em pl's do camarão marinho <i>L. vannamei</i>	42
4.5 Administração dos PS de <i>D. tertiolecta</i> a juvenis do camarão <i>L. vannamei</i>	43
4.5.1 Mortalidade cumulativa dos animais	43
4.5.2 Contagem total de hemócitos (CTH)	44
4.5.3 Atividade da fenoloxidase (PO)	45
4.5.4 Concentração de proteínas totais na hemolinfa (CP)	46
4.5.5 Atividade aglutinante da hemolinfa	47
5 DISCUSSÃO	48
5.1 Cultivos e parâmetros de desenvolvimento da microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	48
5.2 Extração dos polissacarídeos sulfatados	51

5.3 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados	52
5.4 Teste de estresse salino em pl's do camarão marinho <i>L. vannamei</i>	53
5.5 Imunoparâmetros avaliados de juvenis do camarão <i>L. vannamei</i> após a administração dos PS de <i>D. tertiolecta</i>	54
5.5.1 Contagem total de hemócitos (CTH)	54
5.5.2 Atividade da fenoloxidase (PO)	56
5.5.3 Concentração de proteínas totais na hemolinfa (CP)	57
5.5.4 Atividade aglutinante da hemolinfa	58
6 CONCLUSÃO	60
7 REFERÊNCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Os diversos tipos de cultivos de microalgas: A- cultivo <i>indoor</i> aberto; B- cultivo <i>outdoor</i> aberto; C- cultivo <i>outdoor</i> fechado; D- cultivo <i>indoor</i> fechado	20
Figura 2: Células de <i>Dunaliella salina</i> fixadas e desenhadas por Hamburger em 1905.	22
Figura 3: Células verdes e vermelhas de <i>Dunaliella salina</i> agregando-se (acima) e formação de zigoto com os dois tipos celulares (abaixo)	24
Figura 4: Célula de <i>Dunaliella tertiolecta</i> , visualizada em microscópio com contraste de fase, aumento 1000x	24
Figura 5: Principais unidades repetitivas de alguns polissacarídeos sulfatados de algas marinhas. A: Agar (HAMER; BHATTACHARJEE; YAPHEE., 1977), B: <i>lambda</i> -carragenana, C: <i>iota</i> -carragenana, D: <i>kapa</i> -carragenana, E: <i>beta</i> -carragenana (FALSHAW et al., 1996), F: épsilon-carragenana, G: <i>pi</i> -carragenana, H: <i>teta</i> -carragenana (FALSHAW; FURNEAUX, 1995).	26
Figura 6: Biomassa de microalga floculada após as sucessivas lavagens	34
Figura 7: Correlação linear entre a densidade celular (N° de cels mL ⁻¹) e a densidade óptica a 680 nm (A) e curva de crescimento da microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> expressa em N° de cels mL ⁻¹ (B).	40
Figura 8: Correlação linear entre o peso seco (g L ⁻¹) e a densidade óptica a 680 nm (A) e curva de crescimento da microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> expressa em g L ⁻¹ de peso seco (B).	41
Figura 9: Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados totais da <i>Dunaliella tertiolecta</i> em coluna de troca iônica DEAE-celulose eluída com concentrações crescentes de NaCl. As frações de 1 mL foram monitoradas através da metacromasia a 525 nm com azul dimetil dimetileno (DMB).	42
Figura 10: Mortalidade cumulativa de pl's, submetidas ao estresse salino, na presença de diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados obtidos de um cultivo de <i>Dunaliella tertiolecta</i> .	43
Figura 11: Mortalidade cumulativa de juvenis, na presença de diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados obtidos de um cultivo de <i>Dunaliella tertiolecta</i> .	44
Figura 12: Contagem total de hemócitos (CTH) em juvenis de camarões <i>L. vannamei</i> , nos dias 0 e 5. As barras representam à média ± DP. Letras minúsculas representam diferenças significativas (p≤0,05) entre a CTH de todos os tratamentos de cada análise. Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas (p≤0,01) da CTH entre os animais tratados com PS e os animais antes do início do experimento.	45

Figura 13: Atividade da fenoloxidase (PO) em *L. vannamei*, nos dias 0 e 5. As barras representam à média \pm DP de PO.

45

Figura 14: Concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP) em exemplares juvenis do camarão marinho *L. vannamei*, nos dias 0 e 5. As barras representam à média \pm DP de CP. Letras minúsculas representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a CP de todos os tratamentos de cada análise. Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) da CP entre os animais tratados com PS e os animais antes do início do experimento.

46

Figura 15: Atividade hemaglutinante do soro dos camarões, contra eritrócitos de coelho, nos dias 0 e 5. As barras representam à média \pm DP de PO.

47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

\pm - Desvio padrão
 BSA – Albumina sérica bovina
 CaCl₂ – Cloreto de cálcio
 °C – Graus em Celsius
 cel - Células
 CO₂ – Gás carbônico
 CP – Concentração total de proteínas
 CPC – Cloreto de cetilperidínio
 CTA – Centro de Tecnologia em Aquicultura
 CTH – Contagem total de hemócitos
 d⁻¹ – Por dia
 DC – Densidade celular
 DO – Densidade ótica
 DO_{680nm} – Densidade ótica em comprimento de onda de 680 nanômetros
 D_t – Tempo em dias
 EDTA – Etileno Diamino Tetra Acético Dissódico
 EPS – Substâncias poliméricas extracelulares
 g – Grama
 g/L – Grama por litro
 K – Taxa de crescimento
 KCl – Cloreto de potássio
 L-DOPA – L-dihidroxifenilalanina
 L – Litros
 MCF – Microscopia com contraste de fase
 MgCl₂ – Cloreto de magnésio
 mg – Miligramas
 mg/g – Miligrama por grama
 mg/L – Miligrama por litro
 mg/mL – Miligrama por mililitro
 min. – Minutos
 mL⁻¹ – Por mililitro
 mM – Milimolar
 μ m – Micrometros
 M – Molar
 NaCl – Cloreto de sódio
 N_f – Concentração final de células
 nm – Nanômetros
 N_o – Concentração inicial de células
 n^o/mL – Número de células por mililitro
 kg⁻¹ – Por kilograma
 pH – Potencial Hidrogênioico
 pl's – Pós-larvas de camarão
 pl/mL – Pós-larva por mililitro
 PO – Fenoloxidase
 proPO – Pró-fenoloxidase
 PS – Polissacarídeos sulfatados

ROS – *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)

ROIs – Intermediários reativos de oxigênio

RPS – *Released Polysaccharides* (polissacarídeos livres)

TBS – *Tris buffer solution* (Tampão de Tris salino)

v/v – Razão volume por volume

X – Concentração média de células

x g – vezes a força G

WSSV – *White Spot Syndrome Virus* (Vírus da mancha branca)

RESUMO

A aquicultura tem se tornado uma das atividades que mais se expande mundialmente, tendo o cultivo de microalgas e a carcinicultura grande contribuição para este avanço. O presente trabalho teve por objetivo cultivar a microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* e extrair seus polissacarídeos sulfatados do meio de cultivo e biomassa, bem como avaliar os efeitos da administração destes polissacarídeos diretamente na água de cultivo de pós-larvas (pl's) e juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Ao longo dos cultivos da microalga foram avaliados alguns parâmetros de crescimento e desenvolvimento da cultura, da qual foram obtidos o meio de cultivo e a biomassa para a extração dos polissacarídeos sulfatados. Estes polissacarídeos foram administrados diretamente na água, nas concentrações de 0,5; 1 e 2 mg/L, para as pl's de *L. vannamei*, as quais foram submetidas ao teste de estresse salino frequentemente aplicado nas fazendas de camarões para verificar a qualidade das pl's. Os juvenis de camarão também foram expostos às mesmas concentrações de polissacarídeos por um período de 5 dias, em condições de laboratório. Em seguida, foram coletadas amostras da hemolinfa dos animais para a análise de alguns parâmetros hematoimunológicos, como a contagem total de hemócitos (CTH), atividade da enzima fenoloxidase (PO), capacidade de aglutinação da hemolinfa e concentração total de proteínas. Os resultados mostraram um excelente desenvolvimento da microalga *D. tertiolecta*, alcançando um rendimento máximo de 6,67 g.L⁻¹ em biomassa seca, e em 10 L de meio de cultivo, dos quais foram obtidos 2,3 g de polissacarídeos sulfatados brutos. As pl's apresentaram maior resistência ao teste de estresse salino, quando submetidas à concentração de 0,5 mg/L de PS, onde ao final do teste apenas 12,5% dos indivíduos morreram, enquanto a menor mortalidade acumulada nos juvenis (6,7%) foi observada após a administração da maior dose. A análise dos imunoparâmetros não apresentou muitas variações com exceção da contagem total de hemócitos e da concentração de proteínas na hemolinfa, os quais foram significativamente reduzidos com o aumento da dose de polissacarídeos na água. Estudos futuros, principalmente histológicos, serão uma alternativa para esclarecer a possível migração de hemócitos para as brânquias dos animais expostos as maiores concentrações de polissacarídeos na água.

ABSTRACT

Aquaculture is one of the activities that most expands around the world and microalgae such as shrimps cultures have a great contribution into this progress. The aim of this study was the culture of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and extract its sulfated polysaccharides from the biomass and from the culture medium as well as to evaluate the effects of polysaccharides administration directly into the cultivation water of *Litopenaeus vannamei* shrimp's post-larvae and juveniles. During microalgae cultivation some growth parameters and culture development were evaluated, and the sulphated polysaccharides were extracted from biomass and the culture medium. These polysaccharides were directly administrated into the water, in the concentration of 0.5; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ to pl's of *L. vannamei*, wich were submitted to a saline stress often applied to verify the quality of pl's in the most of shrimps farms. The juveniles were exposed to the same concentration of the polysaccharides in a five days period in laboratory conditions. Then, we collected the animals haemolymph to analyze some hematoimmunological parameters, like total haemocyte count (THC), phenoloxidase enzyme activity (PO), haemolymph agglutination capacity and total protein concentration. The results showed an excelent development of the microalgae *D. tertiolecta*, reaching a maximum yield of 6.67 g L⁻¹ in dry biomass and in 10 L of culture medium, from wich were obtained 2.3 g of gross sulphated polysaccharides. The pl's presented high resistance to the saline stress, when submitted to a 0.5 mg L⁻¹ concentration of PS, and at the end of the test only 12.5% of individuals died, while in the juveniles the lower accumulated mortality was 6.7% when the higher dosage of PS was administrated. The analysis of the immunoparameters did not show any variation except the haemocyte total count and haemolymph protein concentration, wich were significantly reduced within the increase of polysaccharides dosage in the water. Future histological studies can be an alternative to reveal the possible haemocytes migration to the animals gills exposed to higher polysaccharides concentration in the water.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são importantes na aquicultura como fonte de alimento e também auxiliam na melhoria da qualidade da água, exercendo um importante papel no balanço do oxigênio, do gás carbônico e dos compostos nitrogenados (DERNER, 1996).

As microalgas também são utilizadas como bioindicadores e fornecem informações sobre o estado trófico de corpos d'água. Estudos mostram que variáveis ambientais, tais como a proporção entre nitrogênio e fósforo, salinidade e o movimento da água influenciam no desenvolvimento destes microorganismos (TROBAJO et al., 2004). Além disso, esses organismos fotossintetizantes são bastante úteis em estratégias de biorremediação (MALLICK, 2002; KALIN; WHEELER; MEINRATH, 2005; MUNOZ; GUIEYSSE, 2006).

A biotecnologia aplicada às algas tem resultado em grandes avanços, principalmente no decorrer das últimas três décadas. Alguns gêneros de microalgas como *Botryococcus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* e *Spirulina* são atualmente cultivadas para produção de proteínas, astaxantina, β -caroteno, glicerol, biocombustíveis, fármacos, além de outros compostos químicos finos (SPOLAORE et al., 2006). As microalgas pertencentes ao gênero *Dunaliella*, especialmente *Dunaliella salina* e *Dunaliella tertiolecta*, são muito utilizadas para estudos e produções em larga escala (BOROWITZKA; SIVA, 2007).

As microalgas têm sido cultivadas pela humanidade por séculos e utilizadas, principalmente, como alimento. Com o passar das décadas, as pesquisas com microalgas têm sido direcionadas para o desenvolvimento de culturas massivas em ambientes abertos e o aprimoramento de estruturas para produções em larga escala, atualmente em funcionamento em várias regiões do mundo (BOROWITZKA, 1999). No entanto, mesmo sistemas em escala reduzida, com baixos custos, têm apresentado algum retorno econômico (SIERRA et al., 2008).

As algas, de uma maneira geral, produzem polissacarídeos que têm despertado grande interesse por causa de algumas de suas propriedades físico-químicas, tornando-os bastantes úteis para propósitos industriais. Estes polissacarídeos podem ser usados nas indústrias como espessantes, estabilizantes e emulsificadores. Cultivos de microalgas como fontes potenciais para uma variedade de produtos, desde combustível à alimentação animal e

também para a obtenção de produtos farmacêuticos já são investigados ao longo de 40 anos. Microalgas do gênero *Phorohiridium* tornaram-se bastante utilizadas em sistemas experimentais por produzirem alto conteúdo de polissacarídeos. Além disso, seu potencial uso como fonte de outros compostos químicos valiosos também se tornou bastante evidente (YOU; BARNETT, 2004).

Atualmente, os potenciais usos biotecnológicos de polissacarídeos naturais alcançaram um maior reconhecimento devido à tendência global do mercado por trocar compostos sintéticos pelos produzidos pela natureza e à crescente necessidade de compreensão das funções dos açúcares sulfatados, bem como a importância da glicosilação na era pós-genômica. Embora os polissacarídeos de macroalgas já venham sendo estudados há muitos anos, os de microalgas permanecem sem elucidação e a grande variedade de açúcares complexos, oriundos do metabolismo das células, ainda representa um grande desafio (ARAD; LEVY-ONTMAN, 2010).

Alguns estimulantes do sistema imunológico inato de peixes e camarões são polissacarídeos neutros como os glucanos, obtidos da parede celular de leveduras e bactérias (ROBERTISEN 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; SHINOHARA; SAKAI, 1998; SAKAI, 1999; BULLOCK et al., 2000; ESTEBAN et al., 2001; GOPALAKANNAN; ARUL, 2006).

Substâncias denominadas de imunoestimulantes têm sido administradas na aquicultura por via de injeções, banhos de imersão ou adicionadas à ração. A escolha da rota de administração pode ser um fator importante na determinação do sucesso do tratamento promovendo uma proteção contra doenças. As formas mais recomendadas para a administração dos imunoestimulantes na aquicultura são via alimentação ou em banhos de imersão, pois causam um baixo nível de estresse aos animais cultivados e são de fácil aplicação (SMITH; BROWN; HAUTON, 2003).

Estes compostos ativam, principalmente, a função fagocítica das células de defesa e elevam suas atividades bacteriostáticas. A estimulação das funções imunológicas está associada com o aumento da proteção contra doenças infecciosas veiculadas na água por diversos patógenos. Além disso, os imunoestimulantes podem diminuir os efeitos negativos do estresse e dos hormônios sexuais no sistema imunológico (SAKAI, 1999).

A imunoestimulação em crustáceos é principalmente de origem profilática já que os imunoestimulantes promovem uma ação no sistema imune não específico, aumentando a

resistência do hospedeiro contra doenças, que na maioria das vezes, são causadas por patógenos oportunistas (RAA, 2000). O autor sugere que os imunostimulantes sejam utilizados em três ocasiões distintas na aquicultura: quando os indivíduos forem submetidos a situações conhecidas de estresse, ou seja, no manuseio, transporte, biometria, aclimação e introdução à alimentação artificial; durante exposições a microorganismos e parasitas; quando forem utilizadas altas densidades de estocagem e também no estágio de desenvolvimento larval, fase em que o animal está particularmente mais suscetível a agentes infecciosos.

Em alguns estudos, os polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* foram administrados na forma de banhos de imersão, em pós-larvas do camarão *L. vannamei* submetidos ao estresse (BARROSO et al., 2007) e incorporados na ração de camarões *L. vannamei* infectados com o vírus da mionecrose infecciosa, o IMNV (COSTA et al., 2006), sendo observados em ambos os casos um aumento significativo da sobrevivência dos indivíduos.

Os resultados obtidos por Lima (2007) também sugerem um possível efeito imunostimulante dos polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha *S. schroederi*, já que aumentaram a sobrevivência dos animais quando administrados, via imersão, a camarões da espécie *L. vannamei* submetidos a condições de estresse.

Existe uma forte relação entre a imunostimulação e a redução da mortalidade de animais aquáticos cultivados submetidos a infecções causadas por bactérias e vírus ou a situações de estresse (SAKAI, 1999). Desta forma, o uso de compostos imunomoduladores, aliado a um bom manejo ambiental, pode contribuir de maneira significativa para o aumento da produção aquícola.

O presente estudo tem como objetivo cultivar a microalga *Dunaliella tertiolecta*, extrair os polissacarídeos sulfatados da biomassa e meio de cultivo, bem como administrar estes polissacarídeos em pós-larvas e juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* submetidos a condições de estresse.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de microalgas

Os primeiros cultivos comerciais de microalgas foram para fins alimentícios e surgiram no início dos anos 60, no Japão, com o uso da clorofícea *Chlorella*, seguido de cultivos da cianofícea *Spirulina* nos anos 70, no México, sendo esta última atualmente cultivada em mais de 22 países inclusive no Brasil. No entanto, os primeiros relatos referentes ao consumo de microalgas pelo homem datam de 2000 anos atrás, quando chineses em tempos de escassez alimentar consumiam a microalga *Nostoc* numa tentativa de sobrevivência (SPOLAORE et al., 2006). Há ainda relatos do consumo de diferentes espécies da cianobactéria *Spirulina*, por povos Aztecas habitantes das proximidades do lago Texcoco, no México, e tribos próximas do lago Chade na África, onde após a coleta de “*blooms*” superficiais, a biomassa seca era utilizada em preparos denominados de *tecuilatl* no México e *dihé* na África (FAO, 2008).

Atualmente, a maior quantidade de indústrias envolvidas no cultivo de microalgas é encontrada nos Estados Unidos e a *Earthrise Nutritionals* é a maior de todas as indústrias com 43 hectares, localizada no deserto Sokora na Califórnia. Na América do Sul, destaca-se o Grupo Solarium de Biotecnologia Adequada ao Desenvolvimento do Deserto, uma empresa chilena, localizada no deserto do Atacama, porém as maiores produções são encontradas na China onde, em 2004, foram produzidas 41.570 toneladas de biomassa de *Spirulina*, o que rendeu 16.6 milhões de dólares aos chineses (FAO, 2008).

Lourenço (2006) relata que a maioria das espécies utilizadas na atualidade permaneceu na obscuridade por muito tempo e só a partir do século XIX passaram a ser estudadas com maior intensidade, mas somente após a 2ª Guerra Mundial surgiu um grande interesse na produção comercial de microalgas, principalmente, em decorrência da grande crise internacional na indústria petrolífera ocorrida na década de 1970. O crescimento rápido e a produtividade elevada das microalgas vêm estimulando, há algumas décadas, pesquisas para o aproveitamento de sua biomassa, sendo considerado um recurso renovável e, com a viabilização de empreendimentos comerciais, também como fonte de renda.

Recentemente, com o crescente aumento da pressão pelo uso de fontes alternativas de combustíveis, foi despertado, mais uma vez, o interesse em se produzir microalgas como uma fonte renovável de biocombustíveis como metanol, biodiesel e biohidrogênio. Mesmo possuindo um custo de produção mais elevado que o de plantas superiores, o uso de microalgas para este fim torna-se viável, visto que não ocupa áreas agricultáveis destinadas a plantação de grãos para a alimentação (CHISTI, 2007). Para servir como boa fonte de biocombustível, as microalgas devem se desenvolver em temperaturas acima de 35°C, pois muitos gases de combustão, como o CO₂, adentram no cultivo sob essas condições, devem suportar variações de pH resultante da injeção deste gás e resistir à presença de outros, como os gases SO_x e NO_x. Além disso, devem ser capazes de acumular grande quantidade de compostos de valor comercial sob condições estressantes ou não e ser produzidas em fotobiorreatores de escala industrial (OLAIZOLA, 2003).

De acordo com Coutteau (1996), as microalgas podem ser produzidas seguindo vários métodos, tipos de cultura e sistemas de cultivo. Dentre os métodos de produção podemos encontrar o estacionário ou “batch”, onde somente uma espécie é cultivada em recipientes contendo água fertilizada e as microalgas são completamente coletadas quando atingem seu máximo desenvolvimento; o semicontínuo, semelhante ao anterior, no entanto, ao atingir o seu ápice de desenvolvimento apenas metade das microalgas é coletada, sendo adicionado mais meio de cultivo; e o método contínuo em que a biomassa é coletada diariamente, ao mesmo tempo em que é adicionado mais meio ao cultivo. As culturas podem ser do tipo axênicas quando estão completamente livres da presença de outros organismos como bactérias; xênicas que permitem a presença de bactérias; ou mistas com várias espécies de microalgas. Quanto aos sistemas de cultivo, podemos encontrar os realizados em ambientes internos (*indoors*) ou em ambientes externos (*outdoors*), em estruturas abertas ou fechadas. As estruturas abertas geralmente são utilizadas em ambientes externos para otimizar a captação de luz solar em tanques dos mais diversos tamanhos e em grandes *raceways*. As estruturas fechadas podem ser usadas tanto em ambientes externos como em internos e são compostas por tubos de vidro (fotobiorreatores), frascos, *carboys* ou grandes bolsões de plástico (Figura 1).

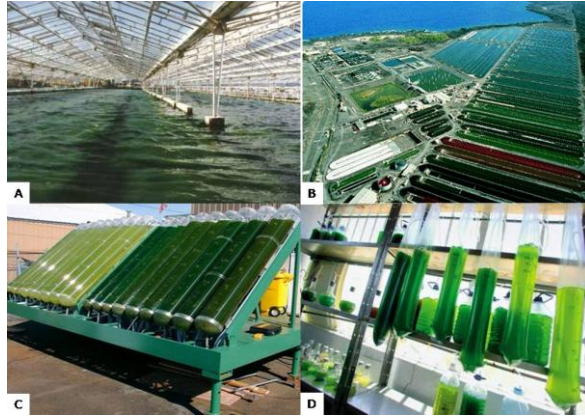


Figura 1: Os diversos tipos de cultivos de microalgas: A- cultivo *indoor* aberto; B- cultivo *outdoor* aberto; C- cultivo *outdoor* fechado; D- cultivo *indoor* fechado (Fonte: www.google.com.br/images/microalgae).

De acordo com Borowitzka (1999), os sistemas para produção de microalgas podem variar de 100 L a volumes superiores a 10^{10} L, sendo estes últimos usados principalmente em cultivos massivos de *Dunaliella salina*. Contudo os mais utilizados apresentam volumes menores que 1000 L, divididos em quatro tipos predominantes: grandes tanques abertos, tanques circulares com pás rotatórias para mistura da água, tanques *raceways* e grandes bolsões plásticos.

Atualmente, os rigorosos controles aplicados na tecnologia para a produção comercial de microalgas permitem que estas possam se desenvolver tanto em ambientes bastante seletivos como em culturas ao ar livre e, mesmo assim, permanecerem ausentes de contaminantes como por exemplo outras algas indesejadas e protozoários (BOROWITZKA, 1999).

As microalgas possuem uma alta eficiência na conversão de energia solar em compostos orgânicos de elevada energia química, já que as mesmas podem converter mais de 5% da energia solar em biomassa (SCHENK et al., 2008). Devido aos altos rendimentos e o melhor crescimento em diferentes condições, comparados aos das plantas terrestres, as microalgas são consideradas como a fonte de biomassa da terceira geração (POSTEN; SCHAUB, 2009).

Existem várias aplicações comerciais para as microalgas, como seu uso para aumentar o valor nutricional de alimentos destinados ao homem e a animais, sendo parte essencial da dieta das primeiras fases de vida de organismos destinados a aquicultura, sua incorporação em cosméticos, sua utilidade no tratamento de efluentes de esgotos domésticos e na fixação do CO_2 emitido para a atmosfera, reduzindo os impactos causados por este gás ao meio ambiente (SPOLAORE et al., 2006; DE-BASHAN et al., 2008; MUNOZ; GUIEYSSE, 2006).

Além da possibilidade de uso no tratamento de esgotos domésticos, as microalgas também podem ser utilizadas no tratamento de efluentes industriais, como no caso da vinhaça, obtida do processamento da cana-de-açúcar. O desenvolvimento das microalgas na vinhaça pode ainda ser acelerado pela adição de CO₂ à cultura e a biomassa resultante servir para gerar energia, a partir da produção de biogás (DOUSKOVÁ et al., 2010).

A biotecnologia aplicada às microalgas tem adquirido força e considerável importância nas últimas décadas devido a utilização da biomassa em alimentos e rações, a obtenção de produtos de alto valor econômico e também suas aplicações ecológicas. Com o avanço dos estudos, o mercado expande cada vez mais as aplicações das microalgas em novas áreas, devido a enorme diversidade de espécies e, com o apoio da engenharia genética, novos produtos têm sido obtidos, a partir de culturas cada vez mais sofisticadas visando atender a alta demanda das indústrias alimentícia e farmacêutica (PULZ; GROSS, 2004).

De acordo com Guzmán-Murillo; Ascencio (2000) o uso de compostos bioativos de microalgas tem sido considerado, recentemente, uma importante alternativa na prevenção de infecções bacteriológicas em animais e em humanos, reduzindo o uso de antibióticos.

A obtenção de compostos biologicamente ativos de microalgas pode ser realizada de diversas formas. Kang et al. (2007) utilizaram solventes naturais em dois estágios e otimizaram a extração de astaxantina, um antioxidante presente em uma microalga do gênero *Haematococcus*. Guzmán-Murillo et al. (2007) extraíram substâncias poliméricas extracelulares (EPS) da microalga *Phaeodactylum tricornutum* através da adição do detergente CPC. Já Parikh; Madamwar (2006) obtiveram os polissacarídeos liberados no meio das microalgas *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Cyanothece* por precipitação com o uso de acetona gelada.

A variação das condições de cultivo também pode influenciar na quantidade de compostos produzidos pelas microalgas. You; Barnett (2004) avaliaram a eficiência dos espectros de luz azul e vermelha em acelerar a taxa de fotossíntese da microalga rodofíceia *Porphyridium cruentum*, o que resultou em um aumento da produção de polissacarídeos sulfatados, mostrando a importância dos diferentes espectros de luz em massificar culturas de organismos fotossintetizantes.

Para Fábregas et al. (1998), a renovação do volume diário do meio de cultivo também pode ser importante para aumentar a produção de compostos valiosos como ficoeritrina, polissacarídeos sulfatados e até ácidos graxos poliinsaturados por microalgas. De acordo com os autores, a renovação de até 50% do volume da cultura, aliada a um efetivo

sistema de iluminação, foram suficientes para estimular a produção de polissacarídeos sulfatados pela microalga *P. cruentum*.

2.2 As microalgas do gênero *Dunaliella*

As microalgas são divididas em grupos, dentre eles a divisão das microalgas verdes, denominada *Chlorophyta*, constituída pelas famílias *Prasinophyceae*, *Ulvophyceae*, *Charophyceae* e *Chlorophyceae*. Esta última com um maior número de representantes com cerca de 2.500 espécies distribuídas em 350 gêneros, sendo os mais conhecidos *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Haematococcus* e *Dunaliella*. Estes gêneros despertaram grande interesse nas mais diversas indústrias pela sua alta produção de lipídios, carotenóides, astaxantinas e outros subprodutos de elevado valor comercial (PULZ; GROSS, 2004).

Mais de um século já se passou desde a primeira vez em que microalgas do gênero *Dunaliella* foram visualizadas em salinas no sul da França por Michel Felix Dunal (1848), sendo a primeira descrição realizada em 1905 por Hamburger e Teodoresco (Figura 2). Estas microalgas são responsáveis pela maior parte da produção primária em ambientes hipersalinos no mundo todo (OREN, 2005).

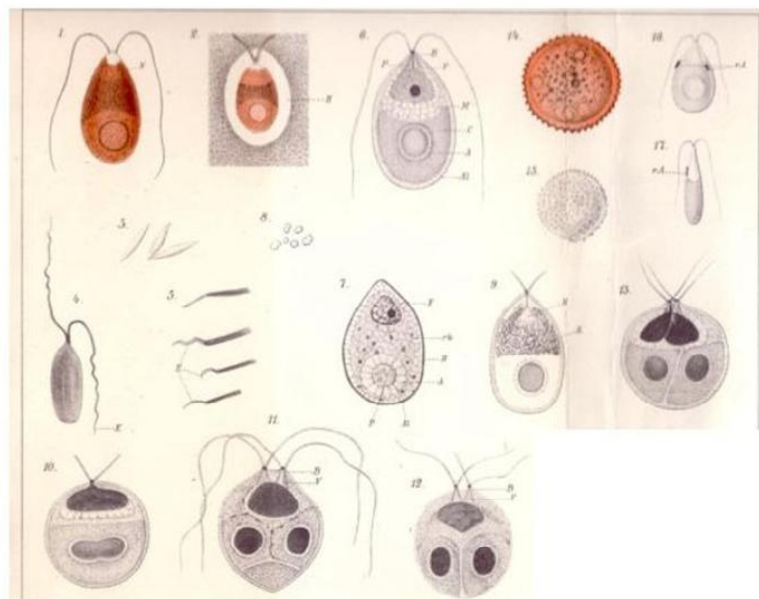


Figura 2: Células de *Dunaliella salina* fixadas e desenhadas por Hamburger e Teodoresco em 1905. (Fonte: Oren, 2005).

Como dito anteriormente, as espécies de microalgas do gênero *Dunaliella* pertencem à família *Chlorophyceae* e são organismos unicelulares que geralmente se apresentam em formato ovóide, com um comprimento de 6 a 15 μm e largura de 4 a 10 μm , possuindo dois flagelos iguais, longos e móveis em cada célula. As principais características morfológicas das microalgas que compõem o gênero, em contraste com os demais gêneros pertencentes as clorofíceas, é o fato das células não possuírem uma parede celular rígida composta de polissacarídeos, e sim uma fina e elástica membrana que envolve o protoplasto. Essa membrana permite a rápida mudança no formato e no volume celular em resposta a alterações osmóticas, o que poderia levar a célula à ruptura sob condições hipotônicas. No entanto, as espécies do gênero *Dunaliella* são consideradas, dentre os organismo eucarióticos, as únicas capazes de prosperar em meios cuja variação salina é muito grande. Sua halotolerância vai desde ambientes quase dulcícolas ($<0,1$ M NaCl) até ambientes extremamente saturados de sal (>5 M NaCl) (BEN-AMOTZ; AVRON, 1993).

As microalgas do gênero *Dunaliella* são alvo de intensos estudos sobre sua fisiologia, bioquímica, ecologia e suas aplicações comerciais devido a diversos fatores, tais como a facilidade no cultivo da grande maioria das espécies e, além da capacidade de desenvolvimento em uma grande variedade de salinidade, possuem uma alta tolerância a metais pesados e pesticidas (BOROWITZKA; SIVA, 2007).

O aumento da salinidade do meio de cultivo faz com que as células de microalgas pertencentes ao gênero *Dunaliella* cresçam de tamanho, comprimento e volume, o que aumenta consideravelmente a produção de glicerol que ajuda a microalga na sua regulação osmótica (BOROWITZKA; SIVA, 2007). As microalgas deste gênero são também capazes de acumular altos níveis de β -caroteno, glicerol e proteínas o que tem mantido grandes produções de *D. salina* na China, Austrália, Israel e Índia (ÇELEKLI; DONMEZ, 2006).

Recentemente, a extração de substâncias exopoliméricas de microalgas (EPS) tem aumentado o interesse em estudos com esse gênero, principalmente em *D. salina*, devido a grande tolerância a altas salinidades o que favorece a produção destas substâncias (MISHRA; JHA, 2009).

A ausência de uma parede celular rígida nas microalgas pertencentes ao gênero *Dunaliella* facilita a reprodução assexuada por divisão longitudinal das células móveis ou a sexuada pela fusão de duas células móveis e formação do zigoto (Figura 3) (Oren, 2005).

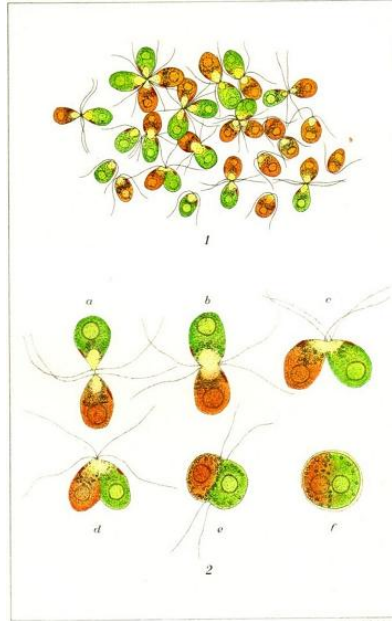


Figura 3: Células verdes e vermelhas de *Dunaliella salina* agregando-se (acima) e formação de zigoto com os dois tipos celulares (abaixo). (Fonte: Oren, 2005).

A espécie *D. tertiolecta*, utilizada no presente trabalho, pertence a ordem Tertiolectae e se caracteriza por apresentar a célula sempre verde, radialmente simétrica, elipsoidal ou oval, com comprimento e largura variando de 5 a 18 e de 4,5 a 14 μm , respectivamente. Os flagelos possuem um comprimento de cerca de 2 a 2,5 vezes o tamanho da célula, os cloroplastos são em forma de copo com pirenóide axial ou basal e com a amilosfera composta de pequenos grânulos distintos de amido. A parte anterior da célula é livre de cloroplastos e transparente, compreendendo cerca de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ do tamanho da célula com muitos grânulos refringentes (Figura 4). A reprodução sexuada é desconhecida para esta espécie, que é marinha e apresenta baixo desenvolvimento em salinidades superiores a 12% (BOROWITZKA; SIVA, 2007).



Figura 4: Célula de *Dunaliella tertiolecta*, visualizada em microscópio com contraste de fase, aumento 1000x (Fonte: Arquivo pessoal).

A microalga *Dunaliella tertiolecta*, quando submetida a salinidades baixas, produz grandes quantidades de lipídios, na forma de fitosteróis, para aumentar sua flutuabilidade e se manter na coluna d'água. Já à medida que a salinidade aumenta reduz a quantidade dos fitosteróis em resposta ao choque osmótico, chegando a cerca de apenas 1% do peso seco da alga (FRANCAVILLA; TROTTA; LUQUE, 2010).

2.3 Polissacarídeos sulfatados de algas

Os carboidratos são moléculas orgânicas que têm na sua estrutura química o radical poliidroxialdeído ou poliidroxicetona, ocorrendo em todos os seres vivos, principalmente nos vegetais. Estes compostos são classificados de acordo com o número de unidades de açúcar em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, os quais são constituídos por vários resíduos de monossacarídeos, unidos por ligações glicosídicas, podendo ainda ser lineares ou ramificados (LEHNINGER et al., 1995).

Os polissacarídeos podem apresentar sulfato na sua estrutura química, sendo denominados de polissacarídeos sulfatados (PS). Por definição, os PS são polímeros formados por unidades repetitivas de açúcares e carregados negativamente devido à presença do radical sulfato (STYER, 1996). Segundo Percival e McDowel (1967), os PS estão presentes nas algas pardas, vermelhas e verdes na forma de fucanas (fucoidanas), galactanas (carragenanas e ágares) e arabino-galactanas, respectivamente.

Os PS podem ocorrer na forma de polissacarídeos livres (CHAKRABATI; PAK, 1980) ou ligados covalentemente a uma cadeia polipeptídica, formando os proteoglicanos (RUOSLAHTI, 1989).

Estudos com PS de macroalgas têm mostrado que suas estruturas variam de espécie para espécie e, às vezes, em diferentes partes das mesmas (DIETRICH et al., 1995). A complexidade na estrutura desses compostos se deve às muitas possibilidades de ligações entre os monossacarídeos e à distribuição de grupos sulfato (ALVES, 2000).

Por serem estudados há mais tempo, os polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas, já possuem relatos na literatura de sua caracterização estrutural (Figura 5), sendo escassos os relatos de caracterização de polissacarídeos extraídos de microalgas, o que dificulta os estudos referentes a estes.

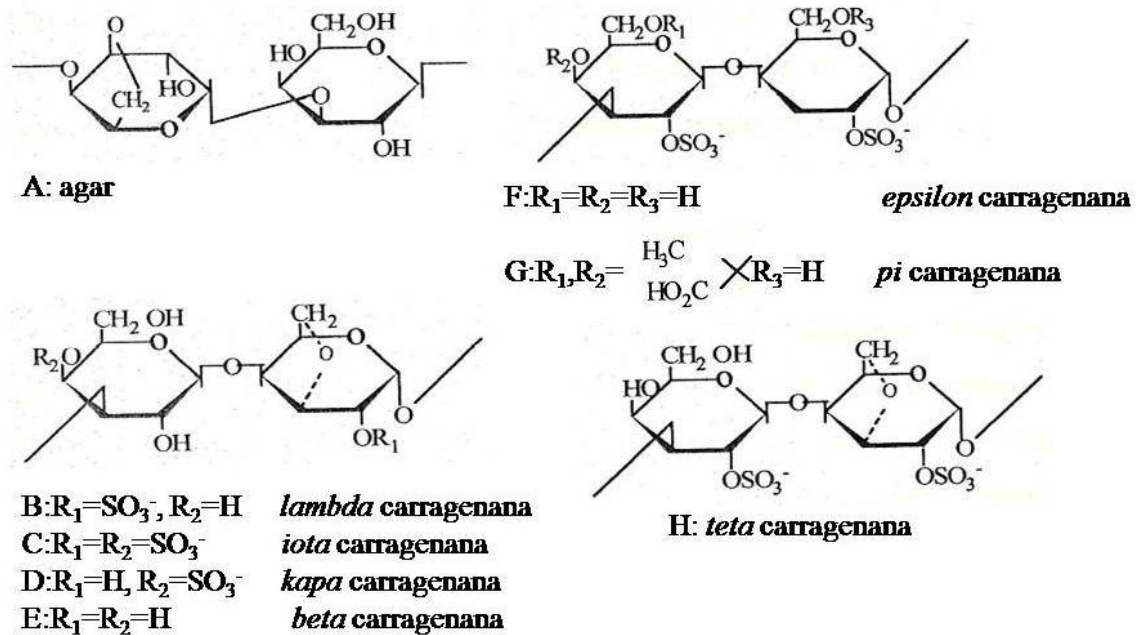


Figura 5: Principais unidades repetitivas de alguns polissacarídeos sulfatados de algas marinhas. A: Agar (HAMER; BHATTACHARJEE; YAPHEE., 1977), B: *lambda*-carragenana, C: *iota*-carragenana, D: *kapa*-carragenana, E: *beta*-carragenana (FALSHAW et al., 1996), F: *epsilon*-carragenana, G: *pi*-carragenana, H: *teta*-carragenana (FALSHAW; FURNEAUX, 1995).

Sendo assim, cada polissacarídeo pode possuir conformação estrutural única e, portanto, apresentar atividades biológicas diferentes ou mais potentes de que outros polissacarídeos, ou outros compostos já descritos. Além disso, diferentes métodos de extração podem, também, resultar em atividades biológicas distintas de um mesmo composto. Deste modo, a identificação de um novo PS ou o desenvolvimento de um novo método de extração vem sempre acompanhada de perspectivas para descoberta de um novo fármaco (ROCHA et al., 2004).

Diferentemente das macroalgas, que geralmente são coletadas no ambiente natural para a extração de PS, as microalgas precisam ser cultivadas para a extração destas substâncias, porém são fáceis de cultivar em grandes quantidades em curtos períodos de tempo (SIMON-BERCOVITCH; BAR-ZVI; ARAD, 1999).

2.4 Substâncias poliméricas extracelulares (EPS)

As bactérias, cianobactérias e microalgas são conhecidas por produzir macromoléculas e exorciar das suas paredes celulares, comumente chamadas de substâncias poliméricas extracelulares, ou EPS (*extracellular polymeric substances*) (COMTE; GUIBAUD; BAUDU, 2008). As EPS que permanecem fortemente ligadas à superfície da célula através de ligações covalentes e não podem ser facilmente removidas são chamadas de “frações ligadas”, já aquelas que são fracamente aderidas à célula e mais facilmente liberadas no meio de cultivo são consideradas como “frações desligadas”. Uma série de estudos sistemáticos têm se desenvolvido em busca de otimizar as formas de isolamento das duas frações de EPS, a partir de meios sintéticos, bem como alterar a composição e quantidade de EPS produzidas nas mais diferentes fases de crescimento dos microorganismos (XU et al., 2009).

As microalgas, assim como algumas plantas superiores, também produzem uma variedade notável de compostos, coletivamente referidos como sendo metabólitos secundários. Estes são sintetizados nas culturas, pelas microalgas, ao final da fase de crescimento exponencial e início da fase de desenvolvimento estacionário e apresentam as mais diversas estruturas químicas e funções fisiológicas (SKULBERG, 2000).

Desde a década de 50, já se sabia que muitas cianobactérias eram capazes de sintetizar polissacarídeos extracelulares que são liberados no ambiente de cultivo. Atualmente, cerca de 70 espécies são estudadas pela capacidade de produção destas moléculas denominadas de RPSs (*released polysaccharides*) visando determinar, principalmente, os açúcares que compõem estes polímeros. Durante o desenvolvimento das culturas, principalmente pelo método estacionário ou “batch”, grandes quantidades destes polissacarídeos são liberados e dissolvidos no meio de cultivo, causando um aumento progressivo na viscosidade do mesmo (DE PHILIPPIS; VICENZINI, 1998).

O complexo de Golgi, uma organela celular bastante dinâmica, é conhecido por ser responsável no processamento, maturação e triagem de novas proteínas, glicoproteínas, proteoglicanas e dos polissacarídeos complexos sintetizados pelo organismo, tanto em animais como em plantas. Sua função de produção de polissacarídeos, principalmente exopolissacarídeos, também foi evidenciada para microalgas como *Porphyridium* sp. (KEIDAN; FRIEDLANDER; ARAD, 2009)

Recentemente, o interesse e a utilização de exopolissacarídeos (RPS) de microorganismos para as mais diversas aplicações industriais aumentou, por ser um recurso que pode ser oferecido com estabilidade e qualidade durante todo o ano, sem ser afetado por safras e variações climáticas em contraste com os polissacarídeos extraídos de plantas e macroalgas (HENÁNDEZ-GUERRERO et al., 2000).

As principais hipóteses para a produção de RPS por microorganismos são a proteção celular contra o estresse em ambientes extremos como salinas e desertos ou outras condições prejudiciais como dessecação e presença de predadores, além de atuarem como agentes antibacteriológicos (DE PHILIPPIS; VICENZINI, 1998). Ainda segundo os autores, uma outra possível atividade para os polissacarídeos de cianobactérias é proteger a enzima nitrogenase de possíveis efeitos prejudiciais do estresse oxidativo.

Os polissacarídeos sulfatados de microalgas são utilizados no desenvolvimento de novas drogas medicinais, especialmente contra infecções virais, bacterianas e por fungos resistentes a antibióticos, bem como no combate ao câncer (HULEIHEL et al., 2001; SKULBERG, 2000).

O estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser a causa direta ou indireta de danos aos tecidos e muitas doenças no homem, como o câncer, arterosclerose, inflamações e até o envelhecimento. Durante décadas, um grande número de polissacarídeos de plantas, algas e outros microorganismos têm apresentado potencial para serem utilizados como antioxidantes naturais. Foi a partir de estudos como esses que os RPS produzidos pela microalga *Rhodella reticulata* se mostraram com enorme potencial para ser utilizados como antioxidantes naturais (CHEN et al., 2010).

Tannin-Spitz et al. (2005) evidenciaram que os polissacarídeos da microalga *Porphyridium* sp. também apresentavam atividade antioxidante. Huleihel et al. (2002) utilizando os polissacarídeos sulfatados da mesma microalga, observaram um impressionante efeito antiviral contra os vírus da herpes simplex tipos 1 e 2. Já Guzman-Murillo; Ascencio (2000) verificaram a atividade antiadesiva *in vitro* de exopolissacarídeos de várias microalgas contra bactérias em células do tecido intestinal, ficando comprovada a eficácia dos compostos testados.

Os RPS de microalgas podem, também, ter seu grau de sulfatação aumentado e assim combater o desenvolvimento de células cancerosas, exibindo propriedades com potencial uso terapêutico (GERESH; MAMONTOV; WEINSTEIN, 2002). No entanto, para que o desenvolvimento desta biotecnologia possa avançar é necessário conhecer detalhes da forma estrutural destes complexos polímeros (GERESH et al., 2009).

2.5 A atividade imunomoduladora dos polissacarídeos sulfatados

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 estes compostos, os PS extraídos de algas marinhas (macroalgas e microalgas) se destacam por apresentarem diversas atividades biológicas tais como: anti-inflamatória, pró-inflamatória, antitumoral, anti-metástica, anti-proliferativa, antiviral, anticoagulante e antitrombótica (BOISSON-VIDAL et al., 1995), sendo as três últimas as mais avaliadas.

Segundo Smith; Brown; Hauton (2003), cinco grupos de imunoestimulantes vêm sendo testados com sucesso na aquicultura, apresentando resultados promissores na sobrevivência de crustáceos expostos experimentalmente a microorganismos patogênicos como bactérias vivas, antígenos bacterianos, glucanas, peptidoglicanas e lipopolissacarídeos. Para Sakai (1999) fatores nutricionais, como vitaminas B e C e hormonais, como o hormônio do crescimento e a prolactina, também vêm sendo utilizados como imunoestimulantes. Ainda segundo o autor, a administração de imunoestimulantes pode aumentar a sobrevivência, bem como melhorar o crescimento de peixes e camarões.

Vargas-Albores (2002) relata que a avaliação da eficiência de um imunoestimulante depende de suas características farmacológicas, das condições fisiológicas do animal e das condições ambientais. Em camarões, por exemplo, existe a possibilidade dos animais não responderem ao tratamento com imunoestimulante devido à má nutrição ou ao comprometimento fisiológico com outros processos como, muda e reprodução. Por outro lado, a falta de resposta também pode ocorrer pelo fato dos organismos se encontrarem saudáveis, bem alimentados ou em boas condições ambientais.

Takahashi et al. (1998) demonstraram a eficácia da administração oral do fucoidam, um PS extraído da alga marinha parda *Cladosiphon okamuranus*, no controle do vírus da mancha branca (WSSV) em camarões da espécie *Marsupenaeus japonicus*. Os autores mostraram que a administração de 60 e 100 mg kg⁻¹ d⁻¹ resultou em sobrevivências de 77 e 76%, respectivamente, enquanto os indivíduos do tratamento que não recebeu o fucoidam apresentaram 100% de mortalidade.

Da mesma maneira, Chotigeat et al. (2004) relataram um aumento significativo da sobrevivência do camarão tigre-gigante *Penaeus monodon* infectado pelo WSSV, após administração oral do fucoidam extraído da alga marinha parda *Sargassum polycystium*.

A imersão de juvenis de camarão *L. vannamei* em solução de β -glucano e de PS extraídos de uma microalga cianofícea *Cyanothece* sp., promoveram respostas semelhantes, ativando o sistema imune através de um aumento da produção de ânion superóxido. Embora esta ativação tenha sido muito similar para os dois açúcares, os PS foram utilizados em uma dosagem 500 vezes menor do que o outro componente testado (CAMPA-CÓRDOVA et al., 2002).

Em outro estudo, os PS extraídos da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* foram adicionados na ração de tilápias, *Oreochromis niloticus*, submetidas à reversão sexual, sendo observado um melhor crescimento dos indivíduos que receberam determinada dose (FARIAS et al., 2004), já os obtidos da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* foram introduzidos na alimentação de pós-larvas de peixes em doses de 0,1 e 0,2 mg/g o que resultou em uma melhor resistência das mesmas a condições estressantes, como falta de oxigênio e má qualidade da água (ARAÚJO, 2006).

As macroalgas marinhas *Spatoglossum schroederi*, *Halymenia pseudofloresia* e *Botryocladia occidentalis* produzem PS capazes de aumentar a resistência de juvenis e pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*, submetidos a condições de estresse em laboratório (LIMA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009; BARROSO et al., 2007).

Polissacarídeos sulfatados extraídos de algumas espécies de algas apresentam uma alta atividade antiviral contra vírus encapsulados, incluindo aqueles capazes de ser altamente patogênicos ao homem como o vírus da imunodeficiência humana. Essa atividade antiviral é baseada na formação de complexos similares aos dos vírus que os impedem de interagir com célula. Esses polissacarídeos podem ser obtidos em grandes quantidades e a baixos custos, apresentando baixa toxicidade e em alguns casos poucos efeitos anticoagulantes (DAMONTE; MATULEWICZ; CERESO, 2004).

2.6 Algumas considerações sobre o sistema imune dos crustáceos

Os crustáceos marinhos estão em constante contato, em seu ambiente natural, com uma grande diversidade de microorganismos, sejam eles patogênicos ou não. A primeira linha de defesa destes animais é fornecida por sua carapaça externa, fazendo a função de uma barreira protetora. A segunda barreira é formada pelo trato digestório do animal, por onde adentram a maioria dos microorganismos, sendo capaz de inativar e digerir a maioria dos invasores, mas caso essas barreiras sejam superadas, é desencadeada, no hospedeiro, uma série de reações imunológicas bastante complexas na tentativa de neutralizar e eliminar o invasor (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008). Mudanças naturais do ambiente, diariamente ou sazonalmente, já submetem os organismos ao sofrimento e, aliadas ao estresse ambiental causado pela presença de poluentes na água, são fatores determinantes para o surgimento e/ou o aumento no número de patógenos (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000).

Os crustáceos, assim como outros invertebrados, só apresentam o sistema imune inato, não específico, diferente dos vertebrados que também apresentam um sistema imune adaptativo, ou específico. Assim, os crustáceos são incapazes de gerar defesas a longo prazo como resposta de vacinas específicas para invasores, porque seu sistema imune não possui memória imunológica (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

O sistema imune inato é a primeira linha que defende o organismo contra o ataque de bactérias, fungos e vírus patogênicos (HOEBE; JANSSEN; BEUTLER, 2004). Esse sistema é essencial na sobrevivência e perpetuação de muitas espécies (SALZET, 2001). Em crustáceos, as respostas imunológicas a nível celular envolvem diretamente as células imunológicas (hemócitos) e as reações humorais são desencadeadas por moléculas solúveis no plasma, assim as duas devem atuar em perfeito sincronismo para maximizar a proteção do organismo contra agentes invasores (CANTELLI, 2009). As moléculas efetoras do sistema imune dos crustáceos (proteínas e peptídeos) são encontradas nos hemócitos, na hemolinfa, e em certos tecidos como as brânquias, por exemplo (GROSS et al., 2001).

Os principais sistemas de defesa reconhecidos nos crustáceos são a coagulação da hemolinfa, a melanização, o reconhecimento e aglutinação celular, os sistemas antibacterianos, antifúngicos e antivirais, a produção de formas reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio e os sistemas fagocítico e de encapsulamento (IWANAGA; LEE, 2005).

Em crustáceos decápodes, os hemócitos circulantes são principalmente dos tipos granulares e semi-granulares, responsáveis pelo reconhecimento de patógenos e a ativação do sistema profenoloxidase (proPO), bem como, a encapsulação e coagulação dos patógenos (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1998). A melanização dos patógenos e danos causados aos tecidos são umas das principais defesas do sistema imune inato dos crustáceos, é um processo controlado pela enzima fenoloxidase (PO), que possui proteínas de reconhecimento padrão, ativada por componentes de superfície de microorganismos, como os lipopolissacarídeos presentes em bactérias Gram-negativas e β -glicanas encontradas em fungos (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004). Ainda de acordo com os autores, concomitante a ativação do sistema proPO, muitas outras reações imunológicas podem ocorrer como a geração de fatores antimicrobiológicos, citotóxicos ou simplesmente a promoção da atividade fagocítica.

Doenças em camarões, principalmente as virais, são uma das causas de efeitos negativos na economia em um grande grupo de países produtores deste organismo na Ásia e nas Américas do Sul e Norte. Estudos sobre a imunidade de camarões e outros crustáceos abrangem os aspectos gerais e consequências no sistema imune, buscando conhecer os mecanismos de resposta a doenças nestes animais (LIU; SÖDERHÄLL; JIRAVANICHPAISAL, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e cultivo das microalgas

A microalga *Dunaliella tertiolecta*, utilizada neste experimento, foi adquirida no cepário do Laboratório de Tecnologia em Aquicultura (CTA) do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará – UFC, onde foi cultivada em recipientes de três litros utilizando meio Guillard f/2, temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, aeração constante e iluminação contínua produzida por duas lâmpadas fluorescentes de 40 W com iluminância de aproximadamente $600 \mu\text{E cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ por um período de 10 dias. Todos os materiais utilizados, bem como, o meio de cultura para o cultivo da microalga foram previamente esterilizados por 20 minutos a 120°C em autoclave e os cultivos foram realizados em triplicata.

3.2 Quantificação da biomassa de *Dunaliella tertiolecta*

O crescimento da microalga foi avaliado por contagem diária da densidade celular (DC) em cel mL^{-1} em uma câmara de Neubauer (hemocitômetro) e através da densidade óptica ($\text{DO}_{680\text{nm}}$) por espectrofotometria a 680 nm. Os valores médios de DO e DC, obtidos de três repetições foram utilizados para estabelecer a correlação linear, determinar a equação de regressão linear e construir a curva de crescimento. Além disso, também foram determinadas a concentração celular média (X), obtida no dia de maior produtividade da cultura (OHSE et al., 2008) e a taxa de crescimento (K) calculada de acordo com a equação descrita por Lourenço (2006): $K = (N_f - N_o) / D_t$, onde: “K” é a taxa de crescimento; N_o e N_f a concentração celular ($\text{n}^{\circ}/\text{mL}$) no início e no dia em que o cultivo obteve a máxima concentração celular, respectivamente e D_t , o tempo de cultivo em dias.

Para as determinações do peso seco da microalga, foram coletadas quatro amostras em diferentes estágios da curva de crescimento. Após a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro ($\text{DO}_{680 \text{ nm}}$), as amostras foram submetidas a uma filtragem em papel filtro, com auxílio de uma bomba de vácuo para a separação da biomassa do meio de cultivo. Em seguida, o material obtido foi seco em estufa a 60°C por 24 horas, e quantificado em balança

analítica, com o objetivo de correlacionar o peso seco em g/L com a $DO_{680\text{ nm}}$, bem como, quantificar a produção de biomassa em g/L ao longo do cultivo.

3.3 Coleta da Biomassa por floculação

A biomassa da microalga foi coletada sempre que as culturas se encontravam ao final da fase exponencial de crescimento, através de floculação induzida por variação do pH do meio de cultivo, através da adição de hidróxido de sódio (NaOH) 2 N. Após um repouso de 24 horas a 4 °C e completa sedimentação da biomassa, o sobrenadante foi decantado, separado da biomassa e estocado a 4°C. A biomassa foi submetida a sucessivas lavagens, a cada 24 horas, para retirada do sal, sendo a salinidade avaliada com um refratômetro. Após a redução da salinidade da água da lavagem para zero, a biomassa foi submetida à secagem em estufa de circulação de ar a uma temperatura constante de 60 °C por 24 ou 48 horas dependendo do volume para secagem.

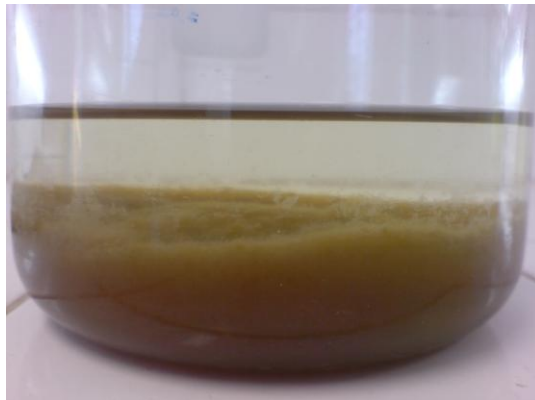


Figura 6: Biomassa de microalga floculada após as sucessivas lavagens (Fonte: Arquivo pessoal).

3.4 Extração de polissacarídeos sulfatados

A extração dos polissacarídeos sulfatados de *D. tertiolecta* foi realizado a partir da biomassa seca e do meio de cultivo, neste último com o objetivo de obter exopolissacarídeos (RPS) liberados no meio pela microalga.

Para a realização da extração de polissacarídeos sulfatados a partir da biomassa, foram hidratados 4 g de biomassa seca em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 + cisteína 5 mM + EDTA 5 mM por 24 horas e adicionados à mistura 90 mL de uma solução de papaína (30 mg/mL). A mistura foi incubada em banho-maria a 60 °C por 24 horas e, em seguida, foi centrifugada (756x g) durante 3 minutos, visando separar a biomassa do sobrenadante. A biomassa foi reutilizada para novas extrações e, ao sobrenadante, foi adicionado álcool etílico absoluto gelado (2:1; v/v), permanecendo em repouso por 24 horas a 4 °C, para a precipitação dos polissacarídeos. Após a precipitação, o material foi novamente centrifugado e o *pellet* resultante seco em estufa a 60 °C por 24 horas.

A extração dos exopolissacarídeos seguiu a metodologia adaptada de Guzmán-Murillo e Ascêncio (2000) e consistiu, inicialmente, em filtrar com papel filtro um litro do meio de cultivo previamente estocado, para retirada de impurezas e restos de biomassa e, logo em seguida, adicionar álcool etílico absoluto gelado (2:1; v/v) para precipitação dos exopolissacarídeos. A mistura permaneceu em repouso a 4 °C por 24 horas e, posteriormente, foi centrifugada a 756x g por 3 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* seco em estufa de circulação de ar a 60 °C por 24 horas.

Para uma pré-purificação dos exopolissacarídeos, 5 g do material seco foram dissolvidos em 500 mL de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 2 M e a mistura mantida em constante agitação por 40 min. em banho-maria a 50 °C. Em seguida, a solução foi centrifugada e, ao sobrenadante, foram adicionados três volumes de álcool etílico absoluto gelado para nova precipitação dos exopolissacarídeos a 4 °C por 24 horas. Após a precipitação, a solução foi centrifugada (756x g; 3 min.) e o *pellet* seco em estufa a 60 °C.

3.5 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados de *D. tertiolecta*

Os polissacarídeos foram submetidos a uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 100mM pH 5,0 + EDTA 5 mM e o fluxo foi mantido em 60 mL.h⁻¹. Para realização da cromatografia, foi aplicado no topo do gel, uma alíquota de 1 mL de uma solução de PS (1 mg.mL⁻¹), a eluição da coluna realizou-se, passo a passo, com o tampão de equilíbrio contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio (0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 M), sendo coletadas frações de 1 mL.

3.6 Animais e desenho experimental

Para este estudo foram utilizados 240 juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (12 ± 1 g), adquiridos junto a Fazenda Aquisia Aquicultura Saraiva LTDA, localizada no município de Paraipaba-CE, e 1.000 pl's, estágio 15, cedidas pela Fazenda Aquacrusta Marinha que se localiza no município de Acaraú-CE.

Após a chegada dos animais ao laboratório, os juvenis foram divididos em duas caixas de 1.000 litros com água em salinidade 10, e as pl's foram acondicionadas em um monobloco plástico para 70 litros contendo água em salinidade 25, salinidades estas as mesmas utilizadas nas respectivas fazendas de origem.

Após a aclimação inicial (2 dias), os juvenis foram distribuídos aleatoriamente em 16 monoblocos de plástico preto, na densidade de 15 camarões por monobloco, com salinidade 10 e aeração constante. Após a estocagem dos indivíduos nos monoblocos, foi realizada uma nova aclimação por 24 horas e, em seguida, iniciou-se a adição dos exopolissacarídeos diretamente na água de cultivo. Foram realizados 3 tratamentos (0,5; 1 e 2 mg/L) com exopolissacarídeos e um controle sem polissacarídeo, sendo os animais alimentados com ração 35% de PB, (2% do peso vivo) em duas refeições diárias. A manutenção da qualidade da água foi controlada através de renovações diárias de 15% do volume nos monoblocos, sempre antes da administração dos polissacarídeos, permanecendo por 5 dias neste sistema.

3.6.1 Teste de estresse salino para pós-larvas

Para tal, inicialmente as pl's foram estocadas na densidade de 1 pl/mL em recipientes plásticos, utilizando um volume total de 10 mL de água na salinidade inicial de 25. Os exopolissacarídeos foram adicionados nas concentrações de 0,5, 1 e 2 mg/L, com um tratamento controle sem polissacarídeo e permaneceram nessas condições por duas horas. Decorrido este tempo, as pl's foram transferidas para outros recipientes contendo água destilada (salinidade zero) na densidade de 0,1 pl's/mL, permanecendo por 30 minutos nessas condições. Em seguida, foram novamente transferidas para os copos com água na salinidade

de 25 onde permaneceram por mais uma hora e o resultado do estresse salino foi avaliado pela contagem de indivíduos mortos.

3.7 Coleta da hemolinfa e análise de imunoparâmetros

Para a coleta da hemolinfa utilizou-se somente os indivíduos juvenis. A coleta da hemolinfa e a análise dos imunoparâmetros seguiram a metodologia descrita por Cantelli (2009), sendo a hemolinfa coletada no dia zero (0) e no dia final do experimento (dia 5), a partir de um *pool* de 3 animais, todas as análises foram realizadas no Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura (LIAA) em Florianópolis-SC. A hemolinfa foi coletada da região dorsal¹ do cefalotórax previamente higienizada com etanol 70%, utilizando-se seringas de 1 mL, contendo uma das seguintes soluções anticoagulantes: AC (27 mM citrato de sódio, 336 mM NaCl, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7,4) ou SIC-EDTA (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA, pH 7,2) + formaldeído 4%, na proporção de 1:2 (hemolinfa:anticoagulante). Outras amostras de hemolinfa, coletadas sem o uso de anticoagulantes, foram depositadas em microtubos e deixadas coagulando por 24 horas a 4 °C para obtenção do soro, através de maceração e sucessivas centrifugações a 756 x g por 5 min. As amostras foram utilizadas para a contagem total de hemócitos (CTH), atividade da enzima fenoloxidase (PO), atividade aglutinante e concentração protéica da hemolinfa.

3.7.1 Contagem Total de hemócitos (CTH)

Para a contagem total de hemócitos, a hemolinfa (30 µL) de cada amostra foi misturada a uma solução SIC-EDTA (450 mM, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM EDTA, pH 7,2) (proporção 1:2), acrescida de 4% formaldeído. O número das células foi então estimado em câmara de Neubauer melhorada, com uso de microscopia com contraste de fase (MCF), em triplicata.

¹ O local correto para coleta da hemolinfa em peneídeos é na região ventral entre o primeiro e o segundo par de segmentos abdominais (CANTELLI, 2009).

3.7.2 Atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade da enzima fenoloxidase (PO) foi avaliada depositando 50 µL do soro (diluído 15x, 35 µL de soro + 490 µL de TBS) de cada amostra em poços de uma microplaca de fundo chato, previamente preenchida com 50 µL de TBS para PO e 100 µL para o controle, na presença de 50 µL de tripsina (1 mg/mL) em todos os poços e, adicionados, também, 50 µL do substrato enzimático dihidroxifenilalanina, L-DOPA (3 mg/mL), com exceção do controle. Em todas as diluições foi utilizada água ultrapura. O rompimento dos hemócitos foi realizado por choque hipotônico para a liberação de todo o conteúdo intracelular. Após 20 min. de incubação a 20 °C, a formação do pigmento vermelho-coral DOPA-cromo foi quantificada em uma leitora de microplacas a 490 nm, sendo a atividade expressa pela variação da absorbância por minuto por miligrama de proteína. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.7.3 Concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP)

A concentração de proteínas da hemolinfa foi realizada, segundo a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando como proteína padrão a albumina sérica bovina (BSA). Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

3.7.4 Avaliação da capacidade hemaglutinante da hemolinfa

As aglutininas presentes (lectinas) na hemolinfa foram tituladas, em triplicatas, através de diluição seriada de 50 µL de soro em 50 µL de TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7,4) em microplacas de 96 poços com fundo em “U” e incubadas com 50 µL de uma suspensão de eritrócitos de coelho a 2% em TBS, por 2 horas a temperatura ambiente. No controle o soro do camarão foi substituído por TBS. O título aglutinante do soro foi expresso como o recíproco da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação, observada pela formação da roseta nos poços.

3.8 Análise estatística

Os dados obtidos referentes aos ensaios realizados em todo o experimento foram submetidos inicialmente a uma análise de variância com fator único (ANOVA) e, no caso de diferenças significativas a nível de 5%, utilizou-se o teste de Tukey para comparação das médias.

4 RESULTADOS

4.1 Cultivos e parâmetros de desenvolvimento da microalga *Dunaliella tertiolecta*

Os cultivos da microalga *Dunaliella tertiolecta* tiveram duração de 10 dias. Os valores de absorvância a 680 nm e os respectivos valores de n° de cels mL⁻¹ de *D. tertiolecta* apresentaram uma forte correlação linear positiva ($R^2 = 0,9996$), que permitiu a obtenção da equação de regressão linear entre estas duas variáveis (Figura 6A).

Nos momentos iniciais do cultivo, na chamada fase de indução ou *Lag*, que durou do primeiro ao quarto dia, as culturas apresentaram uma taxa de crescimento média de $20,6 \times 10^4$ cels mL⁻¹ dia⁻¹. Logo após a adaptação da microalga às condições de cultivo, a taxa de crescimento média aumentou para $47,1 \times 10^4$ cels mL⁻¹ dia⁻¹, caracterizando uma primeira fase de crescimento exponencial ou *Log*, que permaneceu do quarto ao sexto dia de cultivo. Este primeiro crescimento exponencial foi interrompido entre o sexto e sétimo dias do cultivo, quando a taxa de crescimento média foi reduzida para $14,7 \times 10^4$ cels mL⁻¹ dia⁻¹. Do sétimo ao nono dia de cultivo, a cultura entrou em novo crescimento exponencial com uma taxa de crescimento média de $89,65 \times 10^4$ cels mL⁻¹ dia⁻¹ e atingiu uma máxima produção celular média de $375,9 \times 10^4$ cels mL⁻¹ no nono dia de cultivo. A partir deste momento, a cultura entrou em uma rápida fase de declínio e morte, apresentando uma redução de $155,8 \times 10^4$ cels mL⁻¹ do nono para o décimo dia de cultivo (Figura 6B). Ao longo de todo o cultivo a produtividade celular média foi de $126,8 \pm 65,4 \times 10^4$ cel mL⁻¹ dia⁻¹.

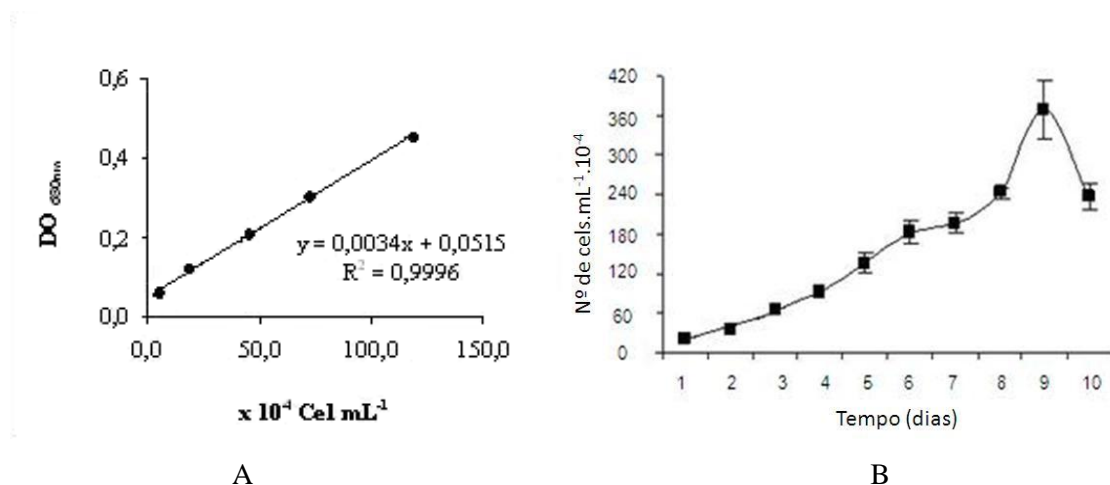


Figura 7: Correlação linear entre a densidade celular (N° de cels mL⁻¹) e a densidade óptica a 680 nm (A) e curva de crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta* expressa em N° de cels mL⁻¹ (B).

Os valores de peso seco e respectivas densidades ópticas ($DO_{680\text{ nm}}$) também apresentaram uma forte correlação linear positiva ($R^2 = 0,9907$), cuja equação de regressão linear possibilitou a quantificação da biomassa seca em g L^{-1} ao longo de todo o cultivo (Figuras 7A e 7B). Assim, na fase de indução, foi produzida em média $0,82\text{ g L}^{-1}\text{ dia}^{-1}$ de biomassa seca, passando para $1,26\text{ g L}^{-1}\text{ dia}^{-1}$ durante o primeiro período de crescimento exponencial. Após a redução da taxa de crescimento já relatada anteriormente, a biomassa voltou a crescer de forma exponencial e alcançou um valor médio de $1,96\text{ g L}^{-1}\text{ dia}^{-1}$. Na fase de morte da cultura a perda de biomassa foi de $2,11\text{ g L}^{-1}\text{ dia}^{-1}$. A biomassa da microalga passou de $0,51\text{ g L}^{-1}$ no primeiro dia de cultivo para $6,67\text{ g L}^{-1}$ no ápice da fase exponencial (nono dia), correspondendo a um aumento de mais de 13 vezes. Ao longo do cultivo, a microalga apresentou um incremento de biomassa médio diário de $0,380 \pm 0,05\text{ g L}^{-1}\text{ dia}^{-1}$, até o dia de maior produção.

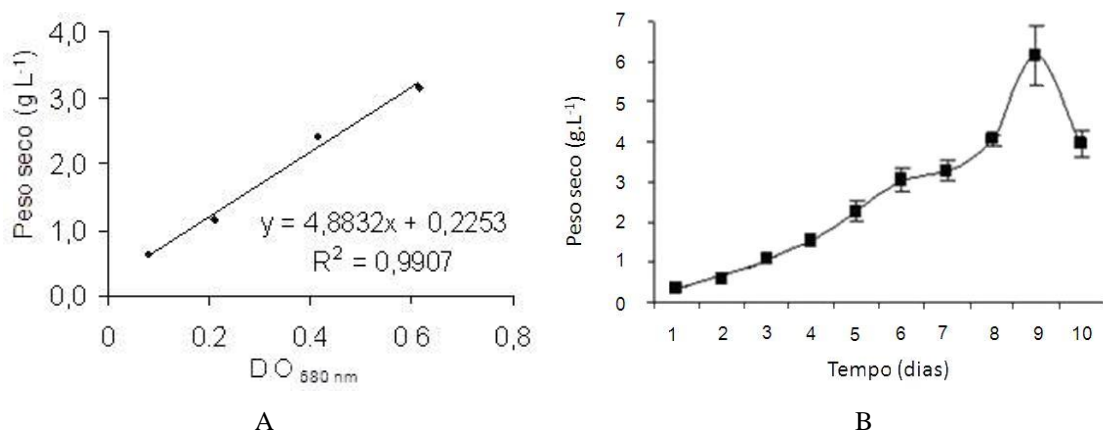


Figura 8: Correlação linear entre o peso seco (g L^{-1}) e a densidade óptica a 680 nm (A) e curva de crescimento da microalga *Dunaliella tertiolecta* expressa em g L^{-1} de peso seco (B).

4.2 Extração dos polissacarídeos sulfatados

A extração dos polissacarídeos sulfatados foi realizada a partir de 4 g de biomassa seca da microalga e de 10 litros de meio da cultura, resultando em 9,8 g de material bruto que após a pré-purificação com uma solução de 2 M de CaCl_2 no que resultou em 2,3 g de polissacarídeos sulfatados totais, correspondendo a um rendimento de 23,5%. A maior parte deste material (2,1 g) foi administrada aos juvenis, outra parte (100 mg) foi administrada as

pós-larvas e o restante (100 mg) usado no fracionamento destes polissacarídeos em coluna de troca iônica.

4.3 Análise cromatográfica dos polissacarídeos sulfatados de *Dunaliella tertiolecta*

Ao final do processo de fracionamento dos polissacarídeos sulfatados totais em DEAE-celulose, foram obtidos, inicialmente, quatro frações minoritárias com baixa metacromasia eluídas entre as concentrações de 0,5 e 1,2 M NaCl. Seguidas de mais quatro frações com uma maior atividade metacromática, eluídas com 1,4 a 2,0 M de NaCl, sendo o maior pico de atividade metacromática constatado na eluição com 1,6 M de sal (Figura 8).

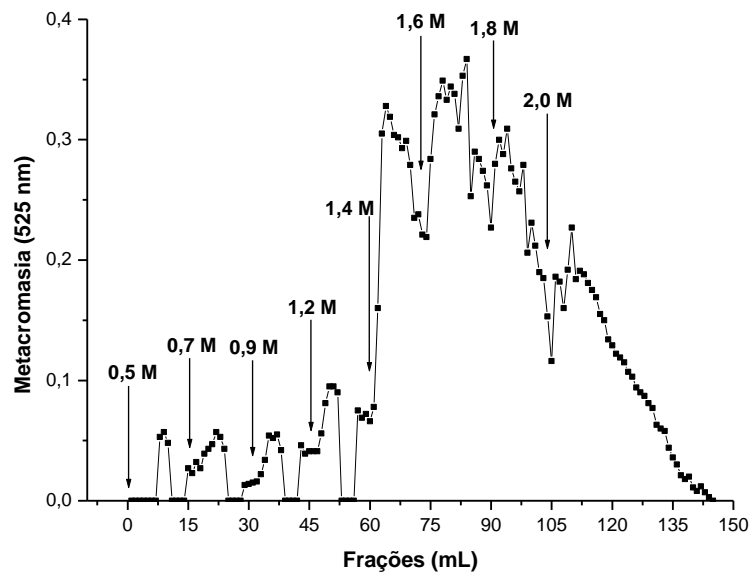


Figura 9: Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados totais da *Dunaliella tertiolecta* em coluna de troca iônica DEAE-celulose eluída com concentrações crescentes de NaCl. As frações de 1 mL foram monitoradas através da metacromasia a 525 nm com azul dimetil dimetileno (DMB). Frações com maior atividade metacromática eluídas com as concentrações 1,4 – 2,0 M de NaCl.

4.4 Teste de estresse salino em pl's do camarão marinho *L. vannamei*

As pl's de camarão foram avaliadas quanto a sua resistência através de um teste de estresse salino. Ao final do experimento, foram contabilizados os animais mortos para cada

tratamento. O tratamento que apresentou uma menor mortalidade cumulativa, com apenas 12,5% de indivíduos mortos, foi o referente a menor dose de PS administrada ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), enquanto o tratamento com a dose intermediária de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e o tratamento controle (sem polissacarídeo) apresentaram uma mortalidade cumulativa de 35% ao final do experimento. O tratamento com a maior dose administrada ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) foi também o que apresentou a maior mortalidade cumulativa, com 40% de indivíduos mortos (Figura 9).

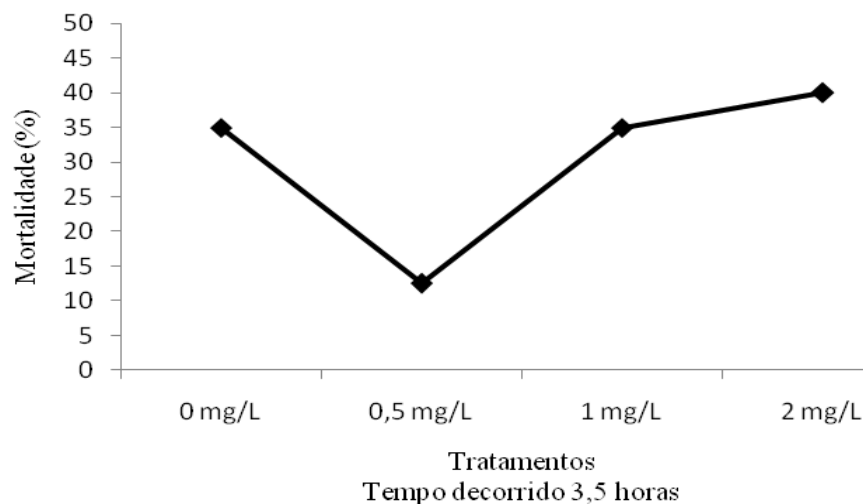


Figura 10: Mortalidade cumulativa de pl's, submetidas ao estresse salino, na presença de diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados obtidos de um cultivo de *Dunaliella tertiolecta*.

4.5 Administração dos PS de *D. tertiolecta* a juvenis do camarão *L. vannamei*

4.5.1 Mortalidade cumulativa dos animais

No caso dos camarões juvenis onde os PS nas concentrações de $0,5$ e 1 mg L^{-1} foram observadas a mesma taxa de mortalidade acumulada de 27%. O tratamento controle, sem adição de PS, apresentou uma taxa de mortalidade acumulada de 47% que foi a maior de todo o experimento. A administração da concentração mais elevada de PS (2 mg L^{-1}) foi a que conferiu uma melhor sobrevivência aos animais, com um taxa de mortalidade acumulada de apenas 6,7% (Figura 10).

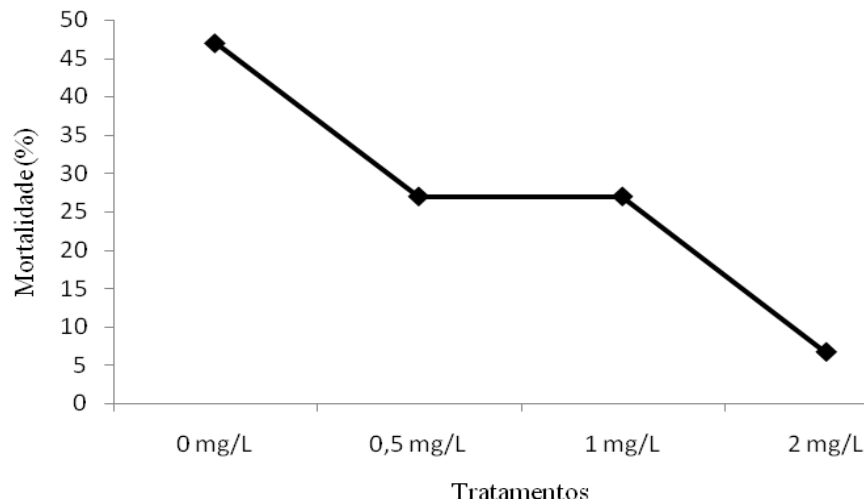


Figura 11: Mortalidade cumulativa de juvenis, na presença de diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados obtidos de um cultivo de *Dunaliella tertiolecta*.

4.5.2 Contagem total de hemócitos (CTH)

No pré-experimento (dia 0), a contagem total de hemócitos foi de $19,55 \times 10^6$ cels mL^{-1} (Figura 11). Observou-se uma queda significativa e crescente no CTH de *L. vannamei* relacionada ao aumento da concentração de PS na água dos monoblocos, ao final do experimento. No tratamento sem a adição de PS, os camarões apresentaram um total de hemócitos de $15,32 \times 10^6$ cels mL^{-1} , enquanto os animais dos tratamentos com adição de 0,5 e 1,0 mg/L de PS apresentaram um total de $7,15 \times 10^6$ e $2,94 \times 10^6$ cels mL^{-1} , respectivamente. Já a contagem dos hemócitos dos animais que receberam a maior dosagem de polissacarídeos (2,0 mg/L) foi reduzida para apenas $1,1 \times 10^6$ cels mL^{-1} . As CTHs obtidas dos camarões que foram expostos aos PS extraídos da microalga *D. tertiolecta* apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) quando comparados entre si, com exceção dos tratamentos com adição de 0,5 mg/L e 1,0 mg/L que foram estatisticamente semelhantes. Quando se compara as CTHs dos animais tratados com PS com a contagem obtida no pré-experimento (dia 0) todos apresentam diferenças significativas ($p \leq 0,01$), mostrando uma evidente tendência de queda na quantidade de hemócitos com o incremento da concentração de PS, que foi reduzida em cerca de 14 vezes na concentração de 2,0 mg/L.

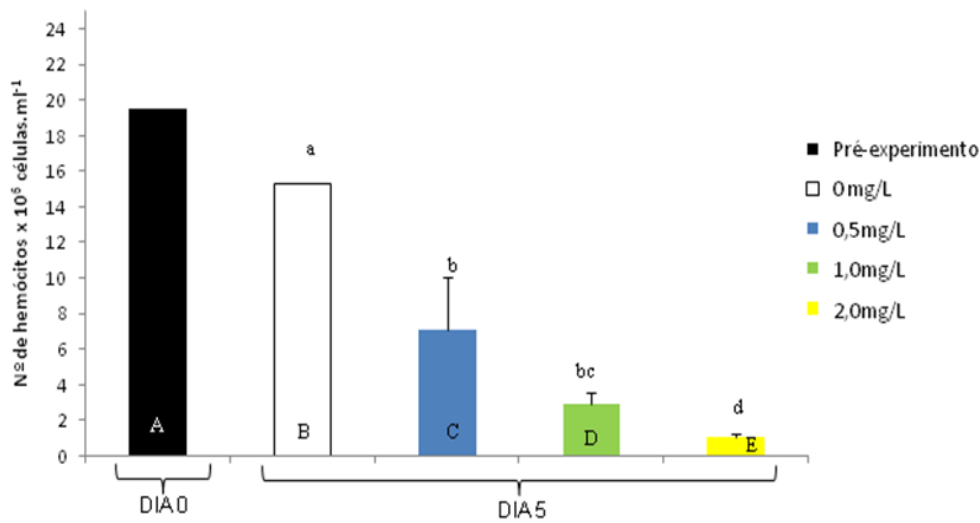


Figura 12: Contagem total de hemócitos (CTH) em juvenis de camarões *L. vannamei*, nos dias 0 e 5. As barras representam a média \pm DP. Letras minúsculas representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a CTH de todos os tratamentos de cada análise. Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas ($p \leq 0,01$) da CTH entre os animais tratados com PS e os animais antes do início do experimento.

4.5.3 Atividade da fenoloxidase (PO)

De uma maneira geral, os valores encontrados para a atividade da enzima fenoloxidase foram bem mais elevados na hemolinfa dos animais antes do início do experimento (Figura 12). Não foram observadas diferenças significativas entre a atividade de PO na hemolinfa dos animais tratados ou não com os PS da microalga, ao final de 5 dias de exposição ao PS.

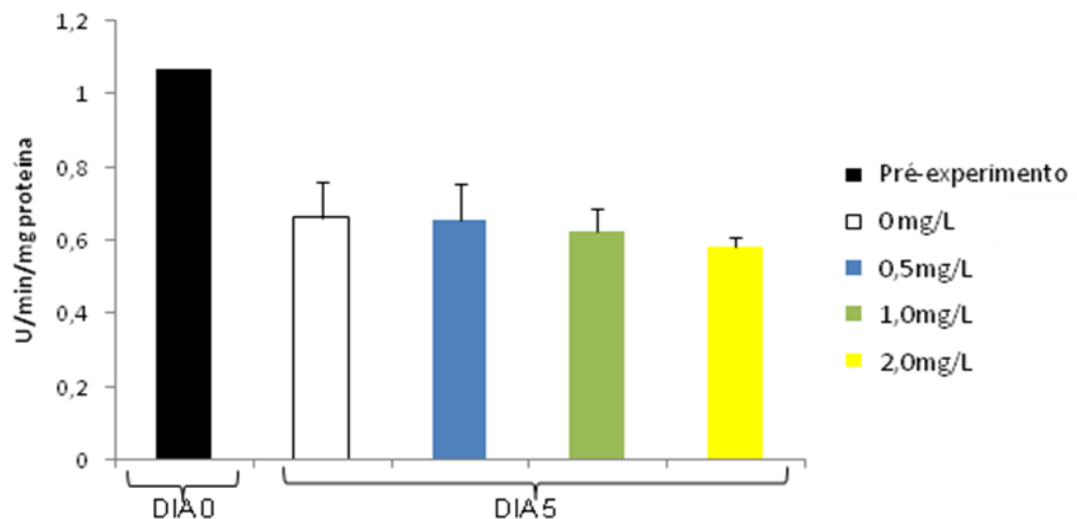


Figura 13: Atividade da fenoloxidase (PO) em *L. vannamei*, nos dias 0 e 5 após a exposição aos PS de *Dunaliella tertiolecta*. As barras representam à média \pm DP de PO.

4.5.4 Concentração de proteínas totais na hemolinfa (CP)

A concentração protéica na hemolinfa dos camarões do pré-experimento (dia 0) apresentou um valor de 330 mg/mL (Figura 13) e, após o período de 5 dias de experimento, os valores pouco se alteraram, permanecendo elevados e não sendo possível evidenciar diferenças significativas entre os tratamentos sem a adição de PS, com aqueles tratados com 0,5 e 2,0 mg/L de PS. Somente no tratamento com adição de 1,0 mg/L de PS, a concentração protéica da hemolinfa ($259,80 \pm 13,87$ mg/mL) mostrou-se significativamente menor ($p \leq 0,05$) das obtidas nos tratamentos de 0 e 0,5 mg/L, sendo contudo estatisticamente semelhante à obtida na maior concentração utilizada.

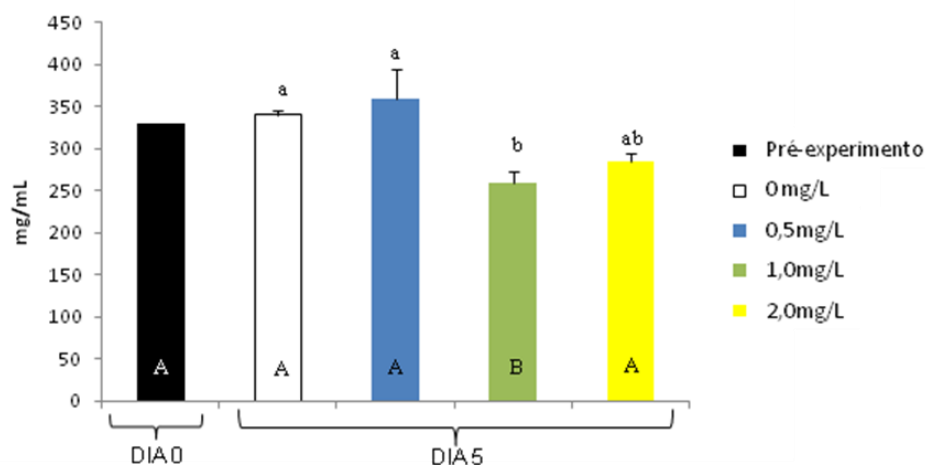


Figura 14: Concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP) em exemplares juvenis do camarão marinho *L. vannamei*, nos dias 0 e 5 após exposição aos PS de *Dunaliella tertiolecta*. As barras representam à média \pm DP de CP. Letras minúsculas representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a CP de todos os tratamentos de cada análise. Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) da CP entre os animais tratados com PS e os animais antes do início do experimento.

4.5.5 Atividade aglutinante da hemolinfa

A atividade aglutinante do soro dos camarões em todos os tratamentos não apresentou diferença significativa. Nos dias 0 e 5 após a exposição dos animais aos PS de *Dunaliella tertiolecta*, ficando os títulos em torno de $\log_2 10$ (Figura 14).

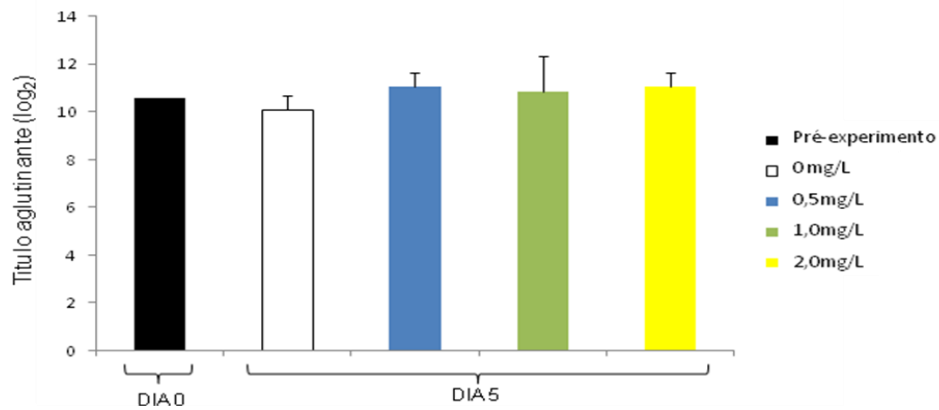


Figura 15: Atividade hemaglutinante do soro dos camarões, contra eritrócitos de coelho, nos dias 0 e 5 após a exposição aos PS de *Dunaliella tertiolecta*. As barras representam à média \pm DP de PO.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados os parâmetros de crescimento e desenvolvimento da microalga *Dunaliella tertiolecta* cultivada em condições de laboratório, bem como a extração dos polissacarídeos sulfatados e o efeito de sua administração à pós-larvas e juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

5.1 Cultivos e parâmetros de desenvolvimento da microalga *Dunaliella tertiolecta*

A microalga utilizada neste estudo apresentou quatro fases de desenvolvimento com características bem distintas entre si. O cultivo iniciou com uma fase de indução um pouco prolongada (1º ao 4º dia), seguida por uma primeira fase de desenvolvimento exponencial (4º ao 6º dia). A partir deste momento, a cultura passou por uma fase de redução do crescimento relativo (6º ao 7º dia), passando de $47,05 \times 10^4$ cels mL⁻¹ para $14,7 \times 10^4$ cels mL⁻¹. Em seguida, a cultura entrou em uma nova fase de crescimento exponencial (7º ao 9º dia), mais acentuada que a primeira, e do 9º ao último dia do cultivo, entrou em uma rápida fase de senescência. Não foi observada a fase estacionária na curva de crescimento da microalga provavelmente pela elevada densidade celular atingida no momento de máximo desenvolvimento da cultura (9º dia) o que levou a uma rápida depleção de nutrientes no meio de cultivo, resultando na morte acelerada da cultura. Fato semelhante foi evidenciado por Moreira (2007) em um cultivo da microalga *Thalassiosira fluviatilis* onde, após o consumo dos nutrientes, não foi observada a fase estacionária, avançando diretamente para a fase de morte da cultura após a fase de crescimento exponencial.

Segundo ROCHA (2001), a curva de crescimento de microalgas é expressa como o incremento da biomassa ou do número de organismos (densidade celular) no tempo. Em um cultivo do tipo “batch” ou estacionário, esta curva pode apresentar cinco fases bem distintas. A 1ª fase, conhecida como fase de indução ou fase lag, ocorre logo após o início do cultivo (repicagem) e existe ou não um pequeno incremento líquido na população devido à adaptação das células algais às novas condições de cultivo. A 2ª fase é chamada de exponencial ou fase log, na qual a biomassa se duplica, sucessivamente, em intervalos regulares de tempo. Com a

continuação do cultivo, o tempo requerido para a duplicação celular aumenta, reduzindo a taxa de crescimento, sendo esta fase denominada de diminuição do crescimento relativo. Isto é consequência da diminuição da concentração de nutrientes no meio, do aumento da concentração metabólitos e da redução da atividade fotossintética por incremento da densidade populacional, a qual diminui a disponibilidade de luz por unidade de célula (autossombreamento). Na 4ª fase de cultivo, não há incremento da população e a taxa de crescimento está compensada pela taxa de mortalidade celular (fase estacionária), devido a maior influência dos fatores acima mencionados. Finalmente, a cultura entra na fase de senescência ou morte, resultado da depleção de nutrientes a um nível que não suporta mais o crescimento e ocorrência de um nível tóxico de metabólitos. A taxa de mortalidade supera a de crescimento e a lise das células favorece a contaminação microbiana.

A avaliação dos parâmetros de crescimento da cepa de *D. tertiolecta*, utilizada neste trabalho, revelou um desenvolvimento bastante satisfatório e, apesar de uma ligeira redução do crescimento relativo devido à queda de energia, alcançou a máxima densidade celular de $375,9 \times 10^4$ cels mL⁻¹ no 9º dia de cultivo. Para *Dunaliella* sp., avaliada por Oliveira (2007) sob as mesmas condições de cultivo, foi constatado o máximo desenvolvimento no sétimo dia (aprox. 400×10^4 cels mL⁻¹), passando por uma fase de crescimento estacionário e, ao nono dia, a cultura já entrou na fase de senescência.

Sebastien; Klein (2006) obtiveram valores um pouco maiores em um cultivo de *D. salina* que alcançou uma densidade máxima celular de 457×10^4 cels mL⁻¹, porém as condições e o tempo de cultivo foram bem diferentes. O cultivo de *Tetraselmis gracilis* foi bem mais prolongado, onde após 20 dias de cultivo, a microalga ainda permanecia em desenvolvimento (SOARES, 2007).

Xin et al. (2010) cultivaram a microalga *Scenedesmus* sp. em efluentes domésticos, tendo como fontes de nitrogênio a ureia e nitrato, obtendo um ótimo desempenho com um total de 10^7 cels mL⁻¹ ao final do cultivo e sendo capaz de remover quase que totalmente (90%) o nitrogênio do ambiente de cultivo. Xin; Hong-ying; Ying-xue (2010) verificaram para a mesma microalga que a utilização de nitrogênio e fósforo próximos à saturação resultaram em um crescimento diário de $2,21 \times 10^6$ cels mL⁻¹ d⁻¹.

A qualidade do inoculo com células em ótimo estado e livre de contaminantes, exerce forte influência no desenvolvimento da cultura independente do meio de cultivo utilizado (PELIZER et al., 2003). A intensidade da cor do cultivo, medida através de espectrofotometria, aumenta proporcionalmente com a elevação do número de células das

microalgas como, por exemplo, nos cultivos da cianofíceia *Spirulina platensis* (Da SILVA, 2004) e da clorofíceia *Haematococcus pluvialis* (SOARES, 2005).

Sato; Yamada; Hirabayashi (2010) verificaram que a luz de forma intermitente foi capaz de intensificar a fotossíntese da microalga *Chaetoceros calcitrans*, tendo como consequência um melhor desenvolvimento celular e produção de biomassa.

Kim et al. (2005) obtiveram um rendimento de $1,9 \text{ g L}^{-1}$ ao cultivarem a microalga *Spirulina platensis* em fotobiorreatores de 5 L. O valor máximo em peso seco da biomassa de *S. platensis* ao ser submetida a cultivos com fontes variáveis de nitrogênio foi de $4,3 \text{ g L}^{-1}$ (RODRIGUES et al., 2010), semelhante ao obtido para a microalga *D. tertiolecta* cultivada durante este trabalho, cuja produção final foi de $4,13 \text{ g L}^{-1}$.

Um dos momentos mais importantes nos cultivos de microalgas é a separação da biomassa do meio de cultivo. A coagulação, filtração, floculação e mesmo a flutuação natural das microalgas são algumas das técnicas aplicadas para separar a biomassa do meio. Kim et al. (2005) utilizaram alguns sais para promover a flutuação natural da cianobactéria *S. platensis*, sendo considerada pelos autores como uma das técnicas de melhor relação custo/benefício. Divakaran; Pillai (2002) utilizaram a quitosana, um polissacarídeo modificado extraído de crustáceos, para flocular quatro diferentes espécies de microalgas e obtiveram ótimos resultados e uma boa relação custo/benefício. No entanto, os autores não conseguiram separar a biomassa da microalga da quitosana e nem os resíduos da quitosana da água de cultivo.

Sais de alumínio, férricos ou de zinco podem ser utilizados na coagulação das microalgas com algum êxito, porém, o uso do alumínio pode causar ruptura das células, o ferro pode alterar a coloração do produto final e o zinco pode causar a adesão das células ao recipiente, dificultando a coleta (PAPAZI; MAKRIDIS; DIVANACH, 2010). O uso de sais de hidróxido de sódio para promover a floculação da biomassa da microalga *D. tertiolecta* e sua separação do meio de cultivo mostrou-se, no presente trabalho, bem eficaz, pois manteve a coloração inicial da microalga, as células permaneceram intactas e a biomassa decantou completamente no fundo recipiente, facilitando sua lavagem e a utilização do meio de cultivo para obtenção de polissacarídeos solúveis (RPS). Os RPSs também podem inclusive atuar como inibidores de floculação, como observado por Chen et al. (2010) quando adicionaram uma certa quantidade de RPS no cultivo de *Aphanothece halophytica* e estes foram capazes de inibir a floculação da microalga.

5.2 Extração dos polissacarídeos sulfatados

A produção celular é máxima quando a cultura chega ao final da fase exponencial de desenvolvimento (LOURENÇO, 2006). Para otimizar a obtenção de polissacarídeos sulfatados de microalgas, deve-se proceder a sua extração justamente nesta fase, pois os rendimentos serão melhores.

Neste estudo, ao final do processo de extração dos polissacarídeos sulfatados (PS) da microalga *D. tertiolecta*, foram obtidos 230 mg mL⁻¹ de PS, provenientes tanto da biomassa como dos polissacarídeos liberados no meio (RPS), o que representa um rendimento de 0,23 mg mL⁻¹.

Guzmán-Murillo et al. (2007) obtiveram 420 mg PS de *Phaeodactylum tricorutum* a partir de 500 mL de meio de cultivo o que corresponde a um rendimento de 0,84 mg mL⁻¹. A partir da biomassa seca da microalga *Dunaliella* sp. foi obtido um rendimento de apenas 20 mg g⁻¹ (OLIVEIRA, 2007). Já para a microalga *Tetraselmis gracilis* o rendimento foi de 51,87 mg g⁻¹ também quando se partiu da biomassa seca (SOARES, 2007).

Seguindo a mesma metodologia de extração aplicada no presente estudo, Mishra; Jha (2009) obtiveram uma produção de 944 mg L⁻¹ de RPS extraídos da microalga *D. salina* quando aumentaram a salinidade do ambiente de cultivo para 5 M de NaCl e, ao reduzirem a salinidade para 0,5 M, a produção do composto diminuiu drasticamente para 56 mg L⁻¹. Parikh; Madamwar (2006) obtiveram da biomassa das microalgas cianofíceas *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cyanothece* 700, 685 e 870 mg g⁻¹, respectivamente. Porém, a maior produção já registrada até a atualidade foi de 22,34 g L⁻¹ em apenas 11 dias de cultivo da microalga *Cyanothece* sp. (CHI; SU; LU, 2007).

As macroalgas *Caulerpa racemosa* e *C. sertularioides* apresentaram rendimentos de 260 e 142 mg g⁻¹, respectivamente (RODRIGUES; FARIAS, 2005; BEZERRA-NETO, 2005). Araújo (2006), obteve um rendimento 722 mg g⁻¹ a partir de 2 g secas da macroalga vermelha *Gracilaria caudata*, enquanto outra macroalga vermelha denominada de *Solieria filiformis* apresentou rendimento de 936 mg g⁻¹ (PONTES, 2005). Rodrigues (2006) obteve em extrações das macroalgas vermelhas *Halymenia* sp. e *H. pseudofloresia* rendimentos de 1079 e 943 mg g⁻¹, respectivamente, enquanto da alga marinha parda *Lobophora variegata* foram extraídos 568 mg g⁻¹ de sua biomassa (ALENCAR, 2007).

5.3 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados

Após o fracionamento dos polissacarídeos sulfatados da microalga *D. tertiolecta* foi constatada a presença de dois grupos bem distintos de polímeros, um grupo de frações minoritárias com uma baixa atividade metacromática e outro composto pelas frações de elevada atividade metacromática. As frações do primeiro grupo foram eluídas com 0,5 a 1,2 M de NaCl, enquanto as majoritárias foram eluídas com 1,4 até 2,0 M de NaCl, sendo a eluída com 1,6 M de NaCl a de maior atividade metacromática.

São poucos os relatos de fracionamentos de PS de microalgas em colunas de DEAE-celulose, sendo esta prática bem mais comum para os PS extraídos de macroalgas.

Um dos primeiros relatos de fracionamento de PS de microalgas foi realizado por Guzmán et al. (2003) quando aplicaram os polissacarídeos das microalgas *Chlorella stigmatophora* e *Phaeodactylum tricorutum* em uma coluna de DEAE-celulose os quais foram fracionados com quatro diferentes concentrações de KCl. Ao final deste processo, os fracionamentos foram similares para as duas microalgas, sendo que o aumento na concentração do sal diminuiu a atividade metacromática dos PS. Oliveira (2007) fracionou os PS da biomassa seca da microalga *Dunaliella* sp. em coluna de DEAE-celulose e verificou uma maior atividade metacromática na fração eluída com 1,0 M de NaCl, sendo também eluídas frações com 0,75 e 0,5 M de NaCl. Outro relato deste procedimento foi realizado por Soares (2007) onde, nas mesmas condições, os PS obtidos da biomassa seca da microalga *Tetraselmis gracilis* foram fracionados utilizando cinco diferentes concentrações salinas, sendo a fração eluída com 0,5 M de NaCl a mais metacromática, ou seja, indicando maior extração.

A DEAE-celulose dos PS das macroalgas *Halymenia pseudofloresia* e *Halymenia* sp. resultou em frações eluídas com 0,5; 0,75 e 1,25 M de NaCl (RODRIGUES, 2006), semelhantes aos obtidos com PS extraídos das algas marinhas verdes *C. racemosa* e *C. sertularioides*, bem como, das macroalgas vermelhas *S. filiformes* e *C. feldmanii*. Em todos os casos, foram observadas diferenças significativas entre as metacromasias das frações eluídas na coluna de DEAE-celulose (PONTES, 2005; BEZERRA-NETO, 2005; RODRIGUES; FARIAS, 2005; TORRES, 2005).

5.4 Teste de estresse salino em pl's do camarão marinho *L. vannamei*

Uma das formas de se avaliar a qualidade das pós-larvas de camarões destinadas ao cultivo é a sua resistência ao teste de estresse por variação na salinidade (BARBIERI JÚNIOR; OSTRENSKY NETO, 2001).

No presente estudo, a exposição de pl's de *Litopenaeus vannamei* à água contendo 0,5 mg L⁻¹ dos PS da microalga *D. tertiolecta*, promoveu sobrevivência de cerca de 90% das pl's submetidas ao teste de estresse salino por 30 minutos apresentando ao final do experimento (3,5 horas) a menor mortalidade (12,5%) dentre as outras concentrações testadas (0, 1,0 e 2,0 mg L⁻¹), (35, 35 e 40%, respectivamente).

O uso de polissacarídeos sulfatados pode ajudar a reduzir o estresse sofrido em organismos cultivados, principalmente em pós-larvas de peixes e camarões. Em outro estudo, Barroso et al. (2007) observaram que as pós-larvas do camarão marinho *L. vannamei* submetidas a banhos de imersão com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga vermelha *B. occidentalis* ficaram mais resistentes ao manejo, reduzindo a mortalidade dos indivíduos ao final do experimento.

Lima et al. (2009) administraram, via imersão, 2 mg L⁻¹ dos polissacarídeos sulfatados, extraídos da macroalga *Spatoglossum schroederi* a juvenis de *L. vannamei* e verificaram uma maior resistência dos animais a condições de hipoxia. Rodrigues et al. (2009) aplicaram também via imersão, durante 45 dias, os polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Halymenia pseudofloresia*, na fase de transição de pós-larvas a juvenis de camarões *L. vannamei*, e constataram uma melhor sobrevivência, consumo alimentar e ganho de peso para os animais tratados com os polissacarídeos.

Azad et al. (2010) submeteram pl's do camarão *Penaeus monodon* a banhos de imersão contendo extratos de vibrios mortos, bem como à alimentação com ração contendo os mesmos extratos. Os autores concluíram que esta estratégia foi mais efetiva em oferecer resistência às pós-larvas do que somente o banho ou somente o extrato na ração. O tratamento com imunostimulantes de forma repetitiva também foi eficaz em aumentar o ganho de peso dos indivíduos em 40%. Ainda segundo os autores, como as respostas primárias e suas influências na imunidade de camarões têm curta duração, a administração de polissacarídeos deve acontecer de maneira bem regular para que a imunidade possa se manter em níveis de proteção. A imunostimulação, aliada à oferta de alimento com qualidade, fez com que as

pós-larvas de *Penaeus monodon* apresentassem um melhor desempenho em cultivos experimentais sem trocas parciais de água (BANERJEE et al., 2010).

5.5 Imunoparâmetros de juvenis do camarão *L. vannamei* após a administração dos PS de *D. tertiolecta*

A utilização de parâmetros hematológicos e bioquímicos para avaliar as condições de saúde de um indivíduo ou grupo de indivíduos, bem como, auxiliar no diagnóstico de enfermidades, é uma prática comum, tanto na medicina humana como na veterinária. Os parâmetros hemato-imunológicos mais empregados em crustáceos são as contagens total e diferencial de hemócitos (hemograma); a atividade da enzima fenoxidase (PO); o índice de fagocitose dos hemócitos; a produção de espécies reativas de oxigênio (ROIs); a atividade antimicrobiana; o título aglutinante e a concentração total de proteínas do plasma (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Dentre todos os parâmetros citados acima, as alterações do número total de hemócitos e a diminuição da capacidade coagulante da hemolinfa são mais evidentes em camarões infectados ou estressados (LEE; CHEN; LIU, 1999).

No presente estudo foi avaliada a influência dos polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga *D. tertiolecta* em alguns imunoparâmetros de juvenis de *Litopenaeus vannamei*, através da contagem total de hemócitos (CTH), atividade da enzima fenoxidase (PO), concentração de proteínas totais (CP) e atividade hemaglutinante da hemolinfa.

5.5.1 Contagem total de hemócitos (CTH)

A CTH mostrou uma variação enorme dentro dos tratamentos utilizados no presente estudo, diminuindo significativamente dependente do aumento da concentração de polissacarídeos administrada na água de cultivo dos camarões. A quantidade de hemócitos no dia “0” foi reduzida em 94,4% ao final de 5 dias de experimento no tratamento com 2 mg de PS/L. Este fato pode ser decorrente da administração dos polissacarídeos diretamente na água, fazendo com que os hemócitos se direcionassem para a região do corpo dos animais que mais

entrou em contato com os polissacarídeos, possivelmente as brânquias. Após a administração dos polissacarídeos, a água do cultivo apresentava um aspecto leitoso e turvo, caracterizando a presença de um composto estranho para os animais que pode ter causado a migração dos hemócitos para esta região mais exposta.

Os hemócitos desempenham um papel crucial no sistema imune dos crustáceos. A contagem total de hemócitos (CTH) pode expressar a condição de saúde dos animais, podendo aumentar ou diminuir de acordo com a exposição a diferentes tipos de agentes causadores de estresse (RODRÍGUEZ; LE MOULLAC, 2000). A maior quantidade de hemócitos no organismo proporciona uma maior proteção contra infecções nos crustáceos, uma vez que estas células são as principais responsáveis pelas diferentes reações imunológicas do indivíduo (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006). De maneira curiosa, alterações dos tipos de hemócitos não são consideradas muito úteis em situações de estresse ou durante infecções (RODRÍGUEZ; LE MOULLAC, 2000; VOGAN; ROWLEY, 2002). A quantidade de hemócitos circulantes em crustáceos pode variar de acordo com as condições do ambiente como o estresse, atividade endócrina, principalmente durante o ciclo de muda e nas infecções (LIU; SÖDERHÄLL; JIRAVANICHPAISAL, 2009).

Duas respostas distintas são desencadeadas nas reações imunes dos camarões. Inicialmente ocorre à migração dos hemócitos para o local de infecção e uma quantidade massiva de peptídeos é liberada na região, logo em sequência, aparecem na hemolinfa e nos hemócitos um aumento na atividade da proteína peneidina-transcricional, o que corresponde a uma reação sistêmica que envolve o processo de proliferação dos hemócitos (MUNOZ et al., 2002).

No presente estudo, ficou bem evidente a redução de hemócitos circulantes na hemolinfa dos camarões à medida que se aumentava a concentração de PS na água de cultivo, provavelmente a contínua exposição das brânquias a estas moléculas, estranhas para o animal, de alguma maneira deve ter estimulado a migração dos hemócitos para esta região, o que futuramente poderá ser comprovado através de estudos histológicos. A administração dos PS diretamente na água de cultivo acompanhado de migração de hemócitos para as brânquias pode ser bastante interessante, já que é através da água que a maioria das doenças são transmitidas. Logo, no momento das invasões de patógenos, essa área do corpo do animal poderá estar mais protegida pelos hemócitos, reduzindo o risco de infecções. A maior quantidade de hemócitos poderá também aumentar a quantidade de moléculas efetoras do sistema imune dos animais nesta região, elevando assim a proteção contra infecções (GROSS et al., 2001). Coincidentemente, a administração da maior dose de PS também resultou numa

menor mortalidade acumulada ao longo do cultivo quando comparada com a obtida no controle sem PS.

Camarões da espécie *L. vannamei* mostram uma imunossupressão, que pode ser transitória, quando ocorre a diminuição no número total de hemócitos e a redução da atividade da enzima fenoloxidase (PO), deixando-os susceptíveis, principalmente a ação de víbrios (CHANG et al., 2007). À medida que infecções, virais se prolongam, o número de hemócitos tende a ser reduzido. Camarões da espécie *L. vannamei* infectados naturalmente com o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), mostraram um declínio no número inicial de hemócitos, onde os animais assintomáticos possuíam $28 \pm 8,2 \times 10^6$ cels/mL e, após o avanço da doença, apresentaram ao final do experimento $20,0 \pm 8,6 \times 10^6$ cels/mL (COSTA, 2007)

Nos estudos realizados por Cantelli (2009), a CTH dos juvenis de camarão *L. vannamei* inicialmente não se alteraram, porém após serem infectados com o vírus da mancha branca (WSSV) passaram a apresentar diminuições no número total de hemócitos (3 dias após a infecção) principalmente àqueles que não foram alimentados com os PS da alga marinha *Gracilaria birdiae*. Assim, é frequentemente relatado que a quantidade de hemócitos diminui na presença de agentes infecciosos, como é o caso das doenças virais (WONGPRASERT et al., 2003).

5.5.2. Atividade da fenoloxidase (PO)

A administração dos PS por 5 dias em juvenis de *L. vannamei* mostrou que a atividade da enzima PO não se alterou para os organismos tratados com os polissacarídeos e apresentou valores bem abaixo do esperado em todos os tratamentos indicando possivelmente um problema metodológico ocorrido e, por outro lado, pelos altos valores de proteínas totais da hemolinfa. A representatividade da enzima PO no total de proteínas para os camarões avaliados atingiu apenas cerca de 0,3% em comparação aos maiores valores encontrados no dia zero.

A biossíntese de melanina nos crustáceos é resultante da ativação do sistema profenoloxidase (proPO), que é reconhecida como uma das principais respostas de reconhecimento nestes animais, que pode ser desencadeada por carboidratos de superfície de microorganismos (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004), resultando na ativação da enzima proPO (RODRÍGUEZ; LE MOULLAC, 2002). O sistema de ativação da proPO já vêm sendo

avaliado a um certo tempo. Em camarões peneídeos as primeiras descrições deste sistema datam do final dos anos 70 e a ativação da enzima proPO são descritas a partir do final dos anos 90.

Cantelli (2009) observou não haver alteração da atividade de PO em animais tratados ou não com PS, mas sim baixou nos animais infectados com WSSV, porém estes valores foram bem mais altos do que os encontrados em nosso estudo. Segundo a autora, quantidades baixas de hemócitos podem ser um dos fatores responsáveis pelas quantidades baixas da enzima PO, visto que estes estão diretamente relacionados com a liberação da enzima na hemolinfa de camarões.

A atividade desta enzima pode ser limitada ou não por fatores ambientais. Algumas espécies de camarões submetidos a condições de estresse por ablação não apresentaram alterações de atividade desta enzima (PERAZZOLO et al., 2002; MAGGIONI et al., 2004). Outras, porém, mostraram ter a atividade da enzima afetada pela presença de infecções ou lesões (VOGAN; ROWLEY, 2002; SARATHI et al., 2007).

5.5.3 Concentração de proteínas totais na hemolinfa (CP)

Os valores de concentração protéica foram bem elevados na hemolinfa dos camarões no dia zero, onde essa concentração total foi de 330 mg mL^{-1} e permaneceu elevada no controle sem PS e nos tratamentos com 0,5 e 2 mg L^{-1} de polissacarídeos. No tratamento em que foi adicionado 1 mg L^{-1} de polissacarídeos houve uma redução significativa na concentração proteica ($259,80 \pm 13,87 \text{ mg mL}^{-1}$), provavelmente uma tentativa de favorecer a homeostase dos organismos.

A concentração total de proteínas na hemolinfa de camarões também é um parâmetro que muito se relaciona com a condição dos camarões cultivados e é muito utilizada para avaliar o estado de saúde destes organismos, sendo sensivelmente afetada por fatores ambientais e fisiológicos (SÁNCHEZ et al., 2001) ou durante infecções e presença de lesões (VOGAN; ROWLEY, 2002).

Em relação às variáveis ambientais apresentadas pela estrutura do laboratório onde foi realizado o experimento, as que poderiam exercer maiores influências foram a temperatura ($29 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) e a salinidade de cultivo (10), pois o oxigênio e o pH mantiveram-se sempre constantes desde o início do experimento.

A hemocianina é uma molécula multifuncional que compreende de 95% de todas as proteínas do plasma de crustáceos (RODRÍGUEZ; LE MOULLAC, 2002) e serve como transportadora de gases em artrópodes, como os crustáceos (DECKER; TERWILIGER, 2000).

Em juvenis saudáveis de *P. vannamei*, mantidos em laboratório, a concentração de proteínas no plasma é em torno de 120 mg mL^{-1} , mas essas concentrações podem variar de acordo com o ambiente, como por exemplo, a quantidade de proteínas ofertada na ração (RODRÍGUEZ; LE MOULLAC, 2002). Costa (2007) ao submeter camarões da espécie *L. vannamei* a desafio com IMNV, evidenciou valores de 105,5 a 141 mg mL^{-1} na concentração de proteínas para animais assintomáticos e animais em estado avançado de infecção, respectivamente.

Em contraste ao que foi avaliado neste estudo, Cantelli (2009) presenciou em seus estudos uma quantidade muito baixa de proteínas totais, explicado pela autora pelo baixo consumo alimentar dos animais ao longo de todo o experimento.

Os valores evidenciados neste estudo e nos trabalhos de Cantelli (2009) mostram as possibilidades de variação deste parâmetro, em virtude da forma de cultivo dos animais e outros fatores não detectados pelo pesquisadores e que podem influenciar, enquanto os valores do presente estudo foram muito elevados (330 mg mL^{-1}), os observados por Cantelli (2009) foram muito baixos ($63,21 \text{ mg mL}^{-1}$) aos relatados na literatura que giram em torno de $90,8 \pm 5.5 \text{ mg mL}^{-1}$ (MERCIER et al., 2006).

5.5.4 Atividade aglutinante da hemolinfa

Os títulos de aglutinação da hemolinfa dos animais tratados com polissacarídeos não apresentaram nenhuma variação entre si, nem mesmo com os animais avaliados no dia zero onde foi notada apenas uma sensível elevação, mas sem diferença significativa entre eles. O mesmo foi constatado por Cantelli (2009), onde os títulos aglutinantes pouco variaram mesmo nos camarões submetidos à infecção com WSSV.

Segundo BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA (2008), algumas infecções ou outras situações como o estresse, podem resultar em alterações dos títulos aglutinantes da hemolinfa, no caso de crustáceos, no entanto, nem sempre os títulos de aglutinação irão variar significativamente entre si. Maggioni et al. (2004), ao submeter fêmeas de *Litopenaeus*

vannamei ao processo de ablação, comumente realizado em reprodutores para maturação sexual, encontrou uma redução significativa do título aglutinante da hemolinfa em resposta a esta prática. Sob a mesma condição de ablação, camarões da espécie *Farfantepenaeus paulensis*, não apresentaram alterações da atividade aglutinante da hemolinfa (PERAZZOLO et al., 2002).

Em contraste ao observado nestes estudos, Costa (2007) evidenciou um aumento na capacidade aglutinante da hemolinfa de camarões *L. vannamei*, quando estes se apresentavam em um alto grau de infecção pelo vírus da mionecrose infecciosa (IMNV).

6 CONCLUSÕES

Após a realização deste estudo conclui-se que:

- O cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta*, em condições de laboratório, apresentou um desenvolvimento bastante satisfatório e foi possível obter polissacarídeos sulfatados brutos, do meio de cultivo e biomassa, em quantidades suficientes para sua administração na água de cultivo de camarões *Litopenaeus vannamei*. Estes polissacarídeos brutos podem ser fracionados e purificados em coluna de troca iônica, resultando em frações com elevada atividade metacromática;
- A administração da menor dose de PS para as pós-larvas resultou em uma menor mortalidade cumulativa, enquanto para os juvenis o melhor efeito foi observado quando foi administrada uma dose quatro vezes superior, aumentando a resistência dos animais às condições ambientais;
- A análise dos imunoparâmetros, de uma maneira geral, não evidenciou nenhum aumento na imunocompetência dos camarões correlacionando com a exposição dos mesmos aos PS. Com exceção da contagem total de hemócitos (CTH) e da concentração protéica da hemolinfa, que apresentaram uma significativa tendência de redução com o aumento da dose de PS, sugerindo um estímulo à migração de hemócitos no local.

7 REFERÊNCIAS

- ALVES, L.G. **Polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha *Sargassum vulgare***. 2000. 86f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Bioquímica). Departamento de Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2000.
- ALENCAR, D. B. **Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata***. 2007. 30f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- ARAD, S.; LEVY-ONTMAN, O. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. **Current Opinion in Biotechnology**, v.21, p.358-364, 2010.
- ARAUJO, G.S. **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**. 2006. 57f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- AZAD, I. S.; PANIGRAHI, A.; GOPAL, C.; PAULPANDI, S.; MAHIMA, C.; RAVICHANDRAN, P. Routes of immunostimulation vis-à-vis survival and growth of *Penaeus monodon* postlarvae. **Aquaculture**, v.248, p.227-234, 2005.
- 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 β -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.
- BANERJEE, S.; KHATOON, H.; SHARIFF, M.; YUSOFF, F. M. Enhancement of *Penaeus monodon* shrimp postlarvae growth and survival without water exchange using marine *Bacillus pumilus* and periphytic microalgae. **Fisheries Science**, v.76, p.481-487, 2010.
- BARBIERI, R. C. J; OSTRENSKY, A. N. Camarões Marinhos: Reprodução, maturação e larviculturas. **Ed. Viçosa: Aprenda Fácil**, v.1, 236p., 2001.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Inmunologia de crustáceos, com ênfase em camarões. In: VIELKA, M. Q.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.), *Guía Práctica de Patología y Inmunología de Camarones Penaeidos*, **ED. CYTED**, p.169-224, 2008.
- BARROSO, F.E.C.; RODRIGUES, J.A.G.; TORRES, W.M.; SAMPAIO, A.H.; FARIAS, W.R.L. Effect of sulfated polysaccharides extracted from the red marine alga *Botryocladia occidentalis* in shrimp post-larvae (*Litopenaeus vannamei*). **Revista Ciência Agronômica**, v,38,n.1, p.58-63, 2007.
- BEN-AMONTZ, A. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. **Annual Review of Microbiology**, v.37, p.95-119, 1983.

BEZERRA-NETO, J.T.B. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides* (Caulerpales, Caulerpaceae)**. 29f. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 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.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.70, p.313-321, 1999.

BOROWITZKA, M. A.; SIVA, C. J. The taxonomy of genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. **Journal of Applied Phycology**, v.19, p.567-590, 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.249-254, 1976.

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 β -glucan and sulfated polysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 12, p. 353-366, 2002.

CANTELLI, L. **Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria birdie* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com o vírus dasíndrome da mancha branca (WSSV)**. 2007. 68f. Dissertação (Pós-graduação em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. the prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v.198, p.116-126, 2004.

CHAKRABATI, B; PAK, J.W. Glycosaminoglycans: structure and interaction. **Journal of Biological Chemistry**, v.8, n.3, p. 225-313, 1980.

CHANG, C.; CHEN, H.; SU, M.; LIAO, I. Immunomodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 10, p. 505-514, 2000.

CHANG, C. C.; WU, Z. R.; KUO, C. M.; CHENG, W. Dopamine depresses immunity in the tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p.24-33, 2007.

CHEN, L.; MEN, X.; MA, M.; LI, P.; JIAO, Q.; LU, S. Polysaccharide release by *Aphanothece halophytica* inhibits cyanobacteria/clay flocculation. **Journal of Phycology**, v.46, p.417-423, 2010.

CHEN, B.; YOU, W.; HUANG, J.; YU, Y.; CHEN, W. Isolation and antioxidant property of the extracellular polysaccharides from *Rhodella reticulata*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.26, p.833-840, 2010.

CHI, Z.; SU, C. D.; LU, W. D. A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanothece* sp. 113. **Bioresource Technology**, v.98, p.1329-1332, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, p.294-306, 2007.

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.

COMTE, S.; GUIBAUD, G.; BAUDU, M.; Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values. **Journal of Hazardous Materials**, v.151, p.185-193, 2008.

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.; LIMAJUNIOR, 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.

COSTA, A. M. **Parâmetros hemato-imunológicos em camarões *Litopenaeus vannamei* durante o avanço da infecção pelo vírus da mononecrose infecciosa (IMNV)**, 2007. 51f. Dissertação (Pós-graduação em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

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.

COUTTEAU, P.; GEURDEN, I.; CAMARA, M. R.; BERGOT, P.; SORGELOOS, P. Review on the dietary effects of phospholipids in fish and crustacean larviculture. **Aquaculture**, v.155, p.149-164, 1997.

ÇELEKLI, A.; DÖNMEZ, G. Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22, p.183-189, 2006.

DA SILVA, C. F. **Cultivo e extração de polissacarídeos sulfatados da microalga *Spirulina platensis***. Monografia de Graduação apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca da UFC, 2004.

DAMONTE, E. B.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, n.18, p.2399-2419, 2004

DE-BASHAN, L. E.; TREJO, A.; HUSS, V. A. R.; HERNANDEZ, J. P.; BASHAN, Y. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potencial for removing ammonium from wastewater. **Bioresource Technology**, v.99, p.4980-4989, 2008.

DECKER, H.; TERWILLIGER, N. Cops and robbers: putative evolution of copper oxygen-binding proteins. **The Journal of Experimental Biology**, v.203, p.1777-1782, 2000.

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v.22, p.151-175, 1998.

DERNER, R. B. **Cultivo de microalgas. In: Produção de camarão marinho.** Florianópolis: UFSC,1996. p.64-75.

DIETRICH, C.P.; FARIAS, G.G.M.; ABREU, L.R.D.; LEITE, E.L.; SILVA, L.F.; NADER, H.B. A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**, v.108, p.143-153, 1995.

DIVAKARAN, R.; PILLAI, V. N. S. Flocculation of algae using chitosan. **Journal of Applied Phycology**, v.14, p.419-422, 2002.

DOUSKOVÁ, I.; KASTÁNEK, F.; MALÉTEROVÁ, Y.; KASTÁNEK, P.; DOUCHA, J.; ZACHLEDER, V. Utilization of distillery stillage for energy generation and concurrent production of valuable microalgal biomass in the sequence: Biogas-cogeneration-microalgae-products. **Energy Conversion and Management**, v.51, p.606-611, 2010.

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, Food and Agriculture Organization of the United Nations. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. **FAO Fisheries and Aquaculture circular**. n.1034, 33p., 2008.

FÁBREGAS, J.; GARCÍA, D.; MORALES, E.; DOMÍNGUEZ, A.; OTERO, A. Renewal rate of semicontinuous cultures of microalga *Porphyridium cruentum* modifies phycoerythrin, exopolysaccharide and fatty acid productivity. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. Santiago, v. 86, i. 5, p.477-481, 1998.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. H. Carrageenans from the tetrasporic stages of *Gigartina calvifera* and *Gigartina alveata* (Gigartinales, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 276, n. 1, p. 155-165, 1995.

FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. H.; WONG, H.; MING-LONG, L.; BACIC, A.; CHANDRKRACHANG, S. Structural analysis of carrageenans from Burmese and Thai samples of *Catenella nipae* Zanardine. **Carbohydrate Research**, v. 285(0): p. 81-98, 1996.

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.

FRANCAVILLA, M.; TROTTA, P.; LUQUE, R.; Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. **Bioresource Technology**, v.101, p.4144-4150, 2010.

GERESH, S.; MAMONTOV, A.; WEINSTEIN, J. Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.50, p.179-187, 2002.

GERESH, S.; ARAD, S.; LEVY-ONTMAN, O.; ZHANG, W.; TEKOA, Y.; GLASER, R. Isolation and characterization of poly and oligosaccharides from the red microalga *Porphyridium* sp. **Carbohydrate Research**, v.344, p.343-349, 2009.

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.

GROSS, P. S.; BARTLETT, T. C.; BROWDY, C. L.; CHAPMAN, R. W.; WARR, G. W. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of haemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. **Developmental & Comparative Immunology**, v.25, p.565-577, 2001.

GUZMAN-MURILLO, M. A.; ASCÊNCIO, F. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. **Letters in Applied Microbiology**. La Paz, Mexico, v. 30, p. 473-478, 2000.

GUZMÁN, S.; GATO, A.; CALLEJA, J. M. Anti-inflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricorutum*. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 224-230, 2003.

GUZMÁN-MURILLO, M. A.; LÓPEZ-BOLAÑOS, C. C.; LEDESMA-VERDEJO, T.; ROLDAN-LIBENSON, G.; CADENA-ROA, M. A.; ASCENCIO, F. Effects of fertilizer-based culture media on the production of exocellular polysaccharides and cellular superoxide dismutase by *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin). **Journal of Applied Phycology**, v.19, p.33-41, 2007.

HAMER, G. K.; BHATTACHARJEE, S. S.; YAPHE, W. Analysis of the enzymic hydrolysis products of agarose by ¹³C-n.m.r. spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 54, c 7-10, 1977.

HERNÁNDEZ-GUERRERO, C. J.; CASAS-VALDEZ, M.; ORTEGA-GARCIA, S.; HERNÁNDEZ-VAZQUEZ, S. Effect of climatic variation on the relative abundance of the red alga *Gelidium robustus* in Baja California Sur, Mexico. **Journal of Applied Phycology**, v.12, p.177-183, 2000.

HOEBE, K.; JANSSEN, E.; BEUTLER, B. The interface between innate and adaptative immunity. **Nature Immunology**, v.5, n.10, 971-974, 2004.

HULEIHEL, M.; ISHANU, V.; TAL, J.; ARAD, S. Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on *Herpes simplex* and *Varicella zoster* viruses. **Journal of Applied Phycology**, v.13, p.127-134, 2001.

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 trermophilum*. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 164, p. 277-288, 1998.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, n.2, p.128-150, 2005.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v.211, p. 213-236, 2006.

KALLIN, M; WHEELER, W. N.; MEINRATH, G. The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. **Journal of Enviromental Radioactivity**, v.78, p.151-177, 2005.

KANG, C.D.; SIM, S.J. Selective extration of free astaxanthin form *Haematococcus* culture using a tandem organic solvent system. **Biotechnology Progress**. Washington, v. 23, n.4, p.866-871, 2007.

KAWAKAMI, H.; SHINOHARA, N.; SAKAI, M. The non-especific 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 Pathology**, v. 33, p.287-292, 1998.

KEIDAN, M.; FRIEDLANDER, M.; ARAD, S. Effect of Brefeldin A in cell-wall polysaccharide production in the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyta) through its effect on the Golgi apparatus. **Journal of Applied Phycology**, v.21, p.707-717, 2009.

KIM, S. G.; CHOI, A.; AHN, C. Y; PARK, C. S.; PARK, Y. H.; OH, H. M. Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular flotation and growth stage determination. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.190-194, 2005.

LEE, K. K.; CHEN, Y. L.; LIU, P. C. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products and a toxic cysteine protease. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v.25, n.13, p.180-192, 1999.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios da Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LE MOULLAC, G.; HAFNER, P. Environment factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, v.191, p.121-131, 2000.

LIMA, P.C.W.deC. **Efeito da administração dos polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* em juvenis e pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei***. 2007. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

LIMA, P. C. W. C.; TORRES, V. M.; RODRIGUES, J. A. G.; SOUSA, J. J.; FARIAS, W. R. L. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* em juvenis de *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, n.1, p.79-85, janeiro-março, 2009.

LIU, H.; SÖDERHÄLL, K.; JIRAVANICHPAISAL, P. Antiviral immunity in crustaceans. **Fish & Shellfish Immunology**, v.27, p.79-88, 2009.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. **Ed: Rima**, v.1, 588p., 2006.

MAGGIONI, D. S.; ANDREATTA, E. R.; HERMES, E. M.; BARRACCO, M. A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. **Aquaculture**, v.241, p.501-515, 2004.

MALLICK, N. Biotechnological potencial of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. **Biometals**, v.15, p.377-390, 2002.

MOREIRA, R.T. **Eficiência do crescimento da microalga *Thalassiosira fluviatilis* em dois diferentes meios de cultivo com variação na concentração de sílica**. 2007. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

MERCIER, L.; PALACIOS, E.; CAMPA-CÓRDOVA, Á. I.; TOVAR-RAMÍREZ, D.; HERNÁNDEZ-HERRERA, R.; RACOTTA, I. S. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. **Aquaculture**, v.258, p.633-640, 2006.

MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. **Bioresource Technology**, v.100, p.3382-3386, 2009.

MUNOZ, M.; VANDENBULCKE, F.; SAULNIER, D.; BACHÈRE, E. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reaction in microbial challenged shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v.269, p.2678-2689, 2002.

- MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. **Water Research**, v.40, p.2799-2815, 2006.
- OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistemas autotróficos estacionários. **Revista Biotemas**, v.21, n.2, p.7-18, 2008.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.459-466, 2003.
- OLIVEIRA, M. A. C. **Cultivo da microalga *Dunaliella sp.* em laboratório. Extração e purificação de polissacarídeos sulfatados.** Monografia de Graduação apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca da UFC, 2007.
- OREN, A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. **Saline Systems**, v.1, 14 p., 2005.
- PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. **Journal of Applied Phycology**, v.22, p.349-355, 2010.
- PARIKH, A.; MADAMWAR, D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v.97, p.1822-1827, 2006.
- 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.
- PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v.56, p.371-375, 2003.
- PERAZZOLO, L. M.; GARGIONI, R.; OGLIARI, P.; BARRACCO, M. A. A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. **Aquaculture**, v.214, p.19-33, 2002.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R.H. Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides. **Academic Press**, ED., Nova Yorque. 1967.
- PONTES, G.C. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Solieraceae, Rhodophyta).** 30f. Monografia. (Graduação) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- POSTEN, C.; SCHAUB, G. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels-A process view. **Journal of Biotechnology**, v.142, p.64-69, 2009.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p.635-648, 2004.

RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: AVANCES EM NUTRICIÓN ACUÍCOLA MEMORIAL DEL V SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA. Yucatán. Mérida, p.47-56, 2000.

ROBERTISEN, 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. **Journal Fish Diseases**, v. 13, p.391–400, 1990.

ROCHA, O.; TAVARES, L. H. S. Produção de plâncton (fitoplâncton de zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. **Ed. Rima**, São Paulo, 2001.

ROCHA, H.A.O.; FARIAS, E.H.C.; BEZERRA, L.C.L.M.; ALBUQUERQUE, I.R.L.; MEDEIROS, V.P.; QUEIROZ, K.C.S.; LEITE, E.L. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. **Infarma**, v.16, n.1, p.82-87,2004.

RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta). In: **XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA**, 1., p. 1693-1701, 2005, Fortaleza. **Anais...Ceará, XIV CONBEP**, 2005. CD-Rom.

RODRIGUES, J.A.G. **Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e seu efeito imunoestimulante no camarão marinho *Litopenaeus vannamei***. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

RODRIGUES, J. A. G.; SOUSA, J. J.; LIMA, P. C. W. C.; LOURENÇO, J. A.; FARIAS, W. R. L. Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Halimena pseudofloresia* mediante estratégia profilática. **Revista Ciência Agrônômica**, v.40, n.1, p.71-78, janeiro-março, 2009.

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen source. **Bioresource Technology**, v.101, p.4491-4498, 2010.

RODRÍGUEZ, J.; LE MOULLAC, G. State of art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. **Aquaculture**, v.191, p.109-119, 2000.

RUOSLAHTI, E. Proteoglycans in cell regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v.264,n.23, p.13369-13372, 1989.

SAKAI, M. Current reserarch status of fish imunoestulants. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 172, n. 1, p. 63-92, 1999.

SALZET, M. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. **Trends in Immunology**, v.22, n.6, p.285-288, 2001.

SARATHI, M.; AHMED, V. P. I.; VENKATESAN, C.; BALASUBRAMANIAN, G.; PRABAVATHY, J.; HAMEED, A. S. S. Comparative study on immune response of

Fenneropenaeus indicus to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v.271, p.8-20, 2007.

SATO, T.; YAMADA, D.; HIRABAYASHI, S. Development of virtual photobioreactor for microalgae culture considering turbulent flow and flashing light effect. **Energy Conversion and Management**, v.51, p.1196-1201, 2010.

SEBASTIEN, N. Y.; KLEIN, V. L. M. Efeito do meio Erb Schreiber no cultivo das microalgas *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.28, n.2, p.149-152, abril-junho, 2006.

SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGNUG, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Research**, v. 1, p.20-43, 2008.

SKULBERG, O. M. Microalgae as a source of bioactive molecules-experience from cyanophyte research. **Journal of Applied Phycology**, v.12, p.341-348, 2000.

SIERRA, E.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; GARCÍA, J. L.; GONZÁLEZ, C.; MOLINA, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v.138, p.136-147, 2008.

SIMON-BERVITCH, B.; BAR-ZVI, D.; ARAD, S.; Cell-wall formation during the cell cycle of *Porphyridium* sp. (Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v.35, p.78-83, 1999.

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

SOARES, N. N. **Cultivo e extração de pigmentos das microalgas *Spirulina platensis* e *Haematococcus pluvialis***. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, 2005.

SOARES, M. I. **Cultivo da microalga marinha *Tetraselmis gracilis* em laboratório extração e purificação de polissacarídeos sulfatados**. 2007. 31f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v.10, p.23-28, 1998.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae, Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, n.2, p.87-96, 2006.

STYER, L. (1996) **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1000p.

TAKAHASHI, Y.; UEHDA, K.; WATANABE, R.; OKUMURA, T.; YAMASHITA, T.; OMURA, H.; KANEMITSU, A.; KAWANO, T.; NARASAKA, H.; SUZUKI, N.; ITAMI, T. Efficacy of oral administration of fucoidan, a sulphated polysaccharide, in controlling White spot syndrome in kuruma shrimp in Japan. In: **ADVANCES IN SHRIMP**

BIOTECHNOLOGY. NATIONAL CENTER FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, Bangkok, v,1, p. 171–173, 1998.

TANIN-SPITZ, T.; BERGMAN, M.; van-MOPPES, D.; GROSSMAN, S.; ARAD, S. Antioxidant activity of the polysaccharides of the red microalga *Porphyridium* sp. **Journal of Applied Phycology**, v.17, p.215-222, 2005.

TINMAN, S.; KELVIN, F.; CARVALHO-FILHO, J. Effect of long-term oral administration of peptidoglycan (PG- Ajinomoto product) on growth rate and immunostimulation response of hybrid tilapia (*O. aureus* X *O. niloticus*). **International Symposium on Tilapia Aquaculture**, 5th. Rio de Janeiro. Proceedings... Rio de Janeiro. v. 2, p. 524-532, 2000.

TROBAJO, R.; COX, E.J.; QUINTANA, X.D. The effects of environmental variables on the morphology of *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta), in relation its use as a bioindicator. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v.79, n.3-4, p.433-445, Nov 2004.

TORRES, V. M. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Champia Feldmannii***. 2005. 28 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2005.

VARGAS-ALBORES, F. Herramientas para determinar inmunoestimulación. In: MEMORIALS DEL SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN AQUICOLA, 6., Cancun. **Anais...** Cancun:[nd], p.48-52, 2002.

VOGAN, C. L.; ROWLEY, A. F. Effects of shell disease syndrome on the haemocytes and humoral defences of the edible crab, *Cancer pagurus*. **Aquaculture**, v.205, p.237-252, 2002.

XIN, L.; HONG-YING, H.; KE, G.; JIA, Y. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogens sources. **Ecological Engineering**, v.36, p.379-381, 2010.

XIN, L.; HONG-YING, H.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v.101, p.5494-5500, 2010.

XU, C.; SANTACHI, P. H.; SCHWEHR, K. A.; HUNG, C. Optimized isolation procedure for obtaining strongly actinide binding exopolymeric substance (EPS) from two bacteria (*Sagittula stella* and *Pseudomonas fluorescens* Biovar II). **Bioresource Technology**, v.100, p.6010-6021, 2009.

WONGPRASERT, K.; KHANOBDEE, K.; GLUNUKAN, S. S.; MEERATANA, P.; WITHYACHUMNARNK, B. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.55, p.3-10, 2003.

YOU, T.; BARNETT, S.M. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. **Biochemical Engineering Journal**. Kingston, v.19, i.3,p.251-258, 2004.