

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA  
PARDA *Spatoglossum schroederi* SOBRE O AUMENTO DA RESISTÊNCIA  
DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* SUBMETIDO A SITUAÇÕES DE  
ESTRESSE.

PAULA CRISTINA WALGER DE CAMARGO LIMA

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL  
DEZEMBRO/2007

EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA  
PARDA *Spatoglossum schroederi* SOBRE O AUMENTO DA RESISTÊNCIA  
DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*, SUBMETIDO A SITUAÇÕES DE  
ESTRESSE.

PAULA CRISTINA WALGER DE CAMARGO LIMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO  
PROGRAMA 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.

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL  
DEZEMBRO/2007

L619e Lima, Paula Cristina Walger de Camargo

Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda  
*Spatoglossum schroederi* sobre o aumento da resistência do camarão  
*Litopenaeus vannamei*, submetido a situações de estresse  
[manuscrito] / Paula Cristina Walger de Camargo Lima  
84 f. : il. color. ; enc.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,  
2007

Orientador: Wladimir Ronald Lobo Farias

1. Macroalgas 2. Carcinicultura 3. Aqüicultura I. Farias, Wladimir  
Ronald Lobo (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Curso de  
Pós-Graduação em Engenharia de Pesca III. Título

CDD 639.2

“OM SRI KALYAY NAMAHA”

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Professor Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão por ter intercedido em meu favor, me indicando ao Mestrado em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará;

Ao Professor Dr. Wladimir Ronald Lobo por sua orientação, amizade, compreensão, incentivo e por acreditar em minha capacidade, me dando a oportunidade maravilhosa de trabalhar em seu laboratório;

Aos professores Dra. Luciane Perazzolo e Dr. José Renato de Oliveria César por terem aceitado participar de minha Banca Examinadora, com suas valiosas contribuições na avaliação de minha dissertação;

Aos professores Dra. Silvana Saker Sampaio, Dr. Alexandre Holanda Sampaio, Dr. Manuel Furtado Neto e Dr. José Wilson Caliope de Freitas, pela amizade, colaboração e contribuições, sempre oportunas;

A FUNCAP, pelo auxílio financeiro nos primeiros meses do mestrado, em prol do desenvolvimento da ciência e tecnologia do Estado de Ceará;

A CNPq, pelo auxílio financeiro cedido durante grande parte do mestrado, possibilitando minha estadia no Estado do Ceará e a execução de meu trabalho;

Ao “Pelotão Coelce” (Ari, Valeska e Beto), pelos longos e “agradáveis” finais de semana sem energia, renovando freneticamente a água de todos os aquários;

Em especial a minha grande parceira de todos os momentos, Valeska Maria, meu “xuxu”, pela dedicação, disponibilidade e amizade;

Ao meu grande amigo José Ariévilo, o cara mais “sensacional” que eu conheci no Ceará, pela ajuda, companhia e conhecimentos compartilhados;

Ao meu grande amigo, “pau para toda obra” e maior concorrente do colchãozinho do laboratório, Júnior Filéh, o qual nunca negou um pedido de ajuda;

A todos os colegas do Laboratório de Bioquímica Marinha, pelos momentos inesquecíveis que passamos nos últimos dois anos. Obrigada pela amizade, auxílio e, principalmente, pelas boas gargalhadas;

Aos amigos Kelma, Daniel, Rômulo, Eliana, Márcia, Jonas, Olavo pelo bate-papo, amizade e companheirismo;

Aos companheiros do curso de mestrado, com quem compartilhei experiências inesquecíveis e valiosas;

Ao aluno de doutorado Jullyermes Lourenço e ao Laboratório de Larvicultura de Camarão Marinho Aquacrusta Marinha Ltda, por terem gentilmente cedidos os exemplares de juvenis e pós-larvas de camarões utilizados em meus experimentos;

A Rogéria, secretária do curso de Pós-graduação em Engenharia de Pesca, pela sua eficiência, atenção e consideração;

Ao Pietro, meu amor e “personal statistical”, pela amizade, carinho, paciência e companheirismo nestes dois anos maravilhosos que passamos no Ceará;

Ao Yuca, meu fiel companheiro de quatro patas, por ter vindo lá de Pontal do Sul só para me cuidar e fazer companhia;

Às minhas Coles queridas que, apesar de estarem tão longe, sempre estiveram tão perto;

Não podia deixar de agradecer a minha grande amiga Eliene que, mesmo a distância, sempre esteve do meu lado, me ajudando e incentivando;

A minha família amada por todo apoio, incentivo, preocupação, amor e pensamentos positivos transmitidos em cada telefonema, durante todos estes meses que fiquei longe;

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização de meu trabalho;

E mais uma vez...

Babaji, Babaji, Babaji!!!

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A história da carcinicultura no Brasil.....	1
1.2. A problemática das doenças na carcinicultura.....	5
1.3. Influência do estresse no desempenho do camarão cultivado.....	9
1.4. Uso de medicamentos químicos na carcinicultura.....	11
1.5. Algumas considerações sobre o sistema imunológico dos crustáceos .....	14
1.6. Uso de substâncias potencialmente imunoestimulantes na carcinicultura.....	20
1.7. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas como fonte de imunoestimulantes.....	23
1.8. Outras atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.....	27
1.9. Polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda <i>Spatoglossum schroederi</i> e suas atividades biológicas.....	30
2. OBJETIVOS.....	37

2.1. Objetivo geral.....	37
2.2. Objetivos específicos.....	37
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1. Coleta e preparo da alga.....	39
3.2. Extração dos polissacarídeos sulfatados.....	39
3.3. Eletroforese em gel de agarose.....	40
3.4. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados.....	41
3.5. Teste de Dubois.....	41
3.6. Ensaio de sobrevivência e ganho de peso após estresse por hipóxia temporária.....	42
3.6.1. Aquisição e manejo dos juvenis de <i>L. vannamei</i> .....	42
3.6.2. Delineamento experimental.....	42
3.6.3. Monitoramento dos polissacarídeos sulfatados na água dos aquários.....	43
3.7. Ensaio de sobrevivência após teste de estresse por choque salino.....	44
3.7.1 Aquisição e manejo das PL's de <i>L. vannamei</i> .....	44
3.7.2. Delineamento experimental.....	45
3.8. Análises estatísticas.....	46
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
4.1. Extração dos polissacarídeos sulfatados.....	47
4.2. Fracionamento em DEAE-celulose.....	48
4.3. Eletroforese em gel de agarose.....	52



<b>4.4. Ensaio de sobrevivência e ganho de peso após estresse por hipóxia temporária.....</b>	<b>53</b>
4.4.1. Parâmetros abióticos da água de cultivo.....	53
4.4.2. Sobrevivência média (%) dos animais.....	54
4.4.3. Biomassa média (g).....	59
4.4.4. Crescimento em peso (g) e comprimento (mm).....	61
<b>4.5. Ensaio imunoestimulante 2.....</b>	<b>64</b>
4.5.1. Sobrevivência média (%).....	64
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>69</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>

## RESUMO

O estresse é o agente imunossupressor mais potente na carcinicultura, causando o declínio das defesas naturais dos camarões, deixando-os enfraquecidos e suscetíveis às contaminações por microorganismos patogênicos, presentes na água e nos sedimentos dos viveiros. Sendo assim, o desenvolvimento de estratégias que visem tornar estes animais mais resistentes é de fundamental importância para o sucesso da atividade. Uma possível solução que vem sendo muito estudada nos últimos anos é o uso de compostos imunoestimulantes como, por exemplo, os polissacarídeos sulfatados (PS) de algas marinhas. O presente trabalho avaliou o efeito dos PS extraídos da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*, no camarão *Litopenaeus vannamei*, submetidos a condições de estresse. Foram realizados dois ensaios, sendo o primeiro com juvenis e o segundo com pós-larvas (PL's) do camarão *L. vannamei*. No primeiro, os PS foram administrados diariamente, através de banhos de imersão, em quatro concentrações, sendo uma controle (nula, 0,0 mg.L<sup>-1</sup>, 1,0 mg.L<sup>-1</sup> e 2,0 mg.L<sup>-1</sup>), possuindo cada tratamento quatro repetições. A administração das doses foi realizada por 33 dias e o estresse induzido no experimento através da supressão parcial da aeração, durante 5 horas, no 23º, 24º e 25º dia. No segundo ensaio, os PS foram administrados por seis dias, também por banhos de imersão, nas concentrações 0,0 mg.L<sup>-1</sup>, 2,0 mg.L<sup>-1</sup> e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>. As PL's foram então submetidas ao teste de estresse por choque salino, comumente utilizado nas fazendas de camarão, com quatro repetições para cada tratamento. Após uma semana, o mesmo ensaio foi repetido, visando averiguar o tempo de ação aparente dos polissacarídeos. Os valores médios de sobrevivência foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e ao teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Em ambos os ensaios, o tratamento 2,0 mg.L<sup>-1</sup> apresentou resultados mais efetivos em relação à sobrevivência média, não sendo evidenciado nenhuma relação entre o aumento da sobrevivência e o aumento da dosagem para 4 mg.L<sup>-1</sup>. Um aparente efeito prolongado do composto também foi detectado uma semana após a administração dos PS. Apesar do aparente efeito imunoestimulante constatado nos ensaios, mais estudos devem ser realizados, buscando otimizar

o tempo e método de administração, como também a dose ideal a ser empregada. Deve-se ainda, avaliar a eficiência imunoestimulante do composto através de testes mais específicos utilizando a hemolinfa e o tecido muscular dos animais.

## ABSTRACT

Stress is the most powerful immunosuppressor agent in shrimp farming, causing the decrease of shrimp's natural defenses, leaving animal weakened and susceptible to contaminations by pathogenic microorganisms from water and sediment. Thus, it is of fundamental importance to the success of the activity the development of strategies that aim to turn these animals more resistant. A possible solution that has been much studied in the last years is the use of immunostimulant compounds such as the sulfated polysaccharides (SP) from marine algae. The present study evaluated the effect of SP extracted from the marine brown alga *Spatoglossum schroederi*, on *Litopenaeus vannamei* shrimps, under stress conditions. Two trials were performed, the first one with juveniles and the second one with post-larvae (PL's) of *L. vannamei*. In the first trial, SP were daily administered, through immersion baths, in four different concentrations, being one control (0,0 mg.L<sup>-1</sup>, 0.5 mg L<sup>-1</sup>, 1.0 mg L<sup>-1</sup> e 2.0 mg L<sup>-1</sup>), with four replicates each. Doses administration was held for 33 days and stress was induced in the experiment through a partial suppression of the aeration, during five hours, in the 23°, 24° and 25° day. In the second trial, SP were administered for five days, also through immersion baths, in concentrations 0,0 mg.L<sup>-1</sup>, 2.0 mg L<sup>-1</sup> and 4.0 mg L<sup>-1</sup>. PL's were then submitted to the chock saline stress test, commonly used in shrimp farms, with four repetitions for each treatment. After one week, the same test was repeated, aiming to ascertain the apparent SP's action time. Survival average values were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey Test, to a significance level of 5%. In both trials, 2.0 mg L<sup>-1</sup> treatments presented more effective results in relation to mean survival, without any relation between the increase of survival and the dosage increase to 4.0 mg L<sup>-1</sup>. An apparent prolonged effect of the compound was also detected a week after SP administration. Despite the apparent immunostimulant effect found in the trials, further studies should be carry out, in order to optimize the time and method of administration and the ideal dose to be used. It should be also evaluated the immunostimulant efficiency of the compound through specific studies using animals haemolymph and muscle tissue.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Exemplar da alga marinha parda <i>Spatoglossum schroederi</i> .....	33
FIGURA 2: Praia do Pacheco, litoral oeste de Fortaleza - CE.....	39
FIGURA 3: Mesolitoral rochoso da Praia do Pacheco, local de coleta das algas.....	39
FIGURA 4: Rendimento (%) dos extratos brutos da alga marinha parda <i>S. schroederi</i> , nas diferentes incubações.....	46
FIGURA 5: Cromatografia em DEAE-celulose dos PS da alga marinha parda <i>Spatoglossum schroederi</i> obtidos, subsequentemente, a partir da 1 <sup>a</sup> (A), 2 <sup>a</sup> (B) e 3 <sup>a</sup> (C) extração.....	48
FIGURA 6: Eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos sulfatados totais presentes nas três extrações realizadas.....	51
FIGURA 7: Sobrevivência (%) média ( $\pm$ DP) diária dos juvenis de <i>L. vannamei</i> , de cada tratamento, submetidos a estresse por hipóxia, realizado no 23 <sup>o</sup> , 24 <sup>o</sup> e 25 <sup>o</sup> dia de experimento.....	53
FIGURA 8: Sobrevivência (%) média ( $\pm$ DP) semanal dos juvenis de <i>L. vannamei</i> , de cada tratamento, submetidos a estresse por hipóxia, realizado no 23 <sup>o</sup> , 24 <sup>o</sup> e 25 <sup>o</sup> dia de experimento.....	54
FIGURA 9: Biomassa (g) média quinzenal ( $\pm$ DP) dos juvenis de <i>L. vannamei</i> , de cada tratamento. ....	59
FIGURA 10: Peso (g) médio ( $\pm$ DP) quinzenal dos juvenis de <i>L. vannamei</i> , de cada tratamento.....	61
FIGURA 11: Comprimento (mm) médio ( $\pm$ DP) quinzenal dos juvenis de <i>L. vannamei</i> , de cada tratamento.....	62
FIGURA 11: Sobrevivência (%) média ( $\pm$ DP) das PL's de <i>L. vannamei</i> , de cada tratamento, submetidas a estresse por choque salino, na primeira e segunda amostragem.....	65

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIações**

ABCC = Associação Brasileira de Criadores de Camarão

ANOVA = Análise de Variância Unifatorial

CPC = Cloreto de Cetil Piridina

DEAE = dimetilaminoetil

DMB = Azul Dimetil Dimetileno

EAO = Espécies Otivas de oxigênio

EDTA = Ácido Etilenodiaminotetraacético

HSV = Vírus do Herpes Simplex

IHHNV = Vírus da Necrose Hipodérmica e Hepatopancreática Infecciosa

IMNV = Vírus da Mionecrose Infecciosa

LPS = lipopolissacarídeos

NaCl = Cloreto de Sódio

PAMPs = padrões moleculares de patógenos

PL's = pós-larvas

PGs = peptidoglicanas

PO = Enzima Fenoloxidase

PS = Polissacarídeos Sulfatados

proPO = Pró-fenoloxidase

PRPs = proteínas de reconhecimento-padrão

TGase = Enzimas Transglutinasas

TSV = Vírus da Síndrome de Taura

WSSV = Vírus da Síndrome da Mancha Branca

YHD = Doença da Cabeça Amarela

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A história da carcinicultura no Brasil

A carcinicultura teve início no Brasil entre os anos de 1972 e 1974, quando a empresa Ralston Purina, juntamente com um grupo de pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco desenvolveram, na Ilha de Itamaracá, estudos com diversas espécies de camarões pertencentes à família Penaeidae. A espécie que mais se destacou nesses testes foi *Litopenaeus vannamei* (PEREZ-FARFANTE; KENSLEY, 1997). Mas como essa era uma espécie exótica, não podendo haver captura de reprodutores na natureza, a empresa decidiu iniciar programas comerciais de produção no Panamá, onde criou a Agromarina do Panamá. Naquele país, tanto em função do clima favorável, quanto da disponibilidade de pós-larvas na natureza ou produzidas em laboratórios, comprovou-se a viabilidade do cultivo comercial da espécie. A falta de transferência das pesquisas do Panamá para Pernambuco, somada ao sigilo que a empresa exigia em relação às informações de valor comercial, impediram que os pesquisadores e as instituições públicas e privadas brasileiras tivessem acesso aos resultados do cultivo realizado no Panamá. A manutenção desse segredo comercial acarretaria um atraso de cerca de 20 anos no desenvolvimento da carcinicultura brasileira (BORGHETTI et al., 2003).

O cultivo comercial de camarões marinhos no Brasil teve início em 1975, no Rio Grande do Norte, com a introdução da espécie exótica *Marsupenaeus japonicus*. No entanto, apesar desta espécie ser a mais cultivada na Ásia, ela

não se adaptou bem às condições brasileiras, principalmente em função das baixas salinidades nas zonas de produção (BARBIERI; OSTRENSKY, 2002). Além disso, a espécie citada exigia dietas ricas em proteína animal e, como não havia rações com tais características no país, as taxas de mortalidade foram muito elevadas em praticamente todos os cultivos realizados. Esse período caracteriza a primeira fase do camarão cultivado no Brasil, onde predominaram cultivos extensivos de baixa densidade de estocagem, reduzida renovação da água e uso da alimentação natural produzida no próprio viveiro (LENOCH, 2004).

Apesar do insucesso, esta primeira fase deixou alguns pontos de apoio que serviram de estímulo para continuar os esforços de viabilização da carcinicultura comercial no Brasil. Contando com fazendas de engorda e laboratórios de produção de pós-larvas (PL's) de camarão instalados e com a experiência acumulada em procedimentos e práticas de produção, os técnicos e produtores envolvidos no setor partiram para a domesticação das espécies nativas, *Litopenaeus schmitti* (OSTRENSKY, 1997) e *Farfantepenaeus paulensis* (WASIELESKY, 2000), nas regiões sul e sudeste, e *Farfantepenaeus subtilis*, no norte e nordeste (TAVARES; SANTOS, 2006). Este período passa a constituir a segunda fase da evolução da carcinicultura nacional, no qual alguns cultivos passaram a adotar uma maior densidade de povoamento (4 a 6 camarões.m<sup>-2</sup>), taxas de renovação de água de 3% a 7% e alimento concentrado. Ficou caracterizado nesta fase, o primeiro intento de estabelecer um sistema semi-extensivo para produzir o camarão na região Nordeste. Entretanto, a baixa produtividade e a pouca lucratividade dessas espécies



provocaram a desativação de diversas fazendas na região, as quais voltaram à produção de sal (CADEIA PRODUTIVA DO CAMARÃO MARINHO, 1999).

A decisão de descontinuar a domesticação das espécies nativas no Nordeste, como opção para viabilizar a carcinicultura no Brasil, levou o grupo pioneiro de técnicos e produtores a buscar solução com a espécie exótica *L. vannamei*, ainda na década de 80. Entretanto, só a partir de 1992, com a divulgação dos resultados de um longo trabalho realizado pela empresa Aquatec, no Rio Grande do Norte, os cultivos de *L. vannamei* começaram a se popularizar no país (BORGHETTI et al., 2003), após ficar constatado seu elevado grau de rusticidade no manejo, taxa de crescimento uniforme, fácil adaptabilidade, com características zootécnicas desejadas e reprodução satisfatória em laboratório. Além disso, o nordeste do Brasil apresenta, durante todo o ano, condições climáticas ideais ao cultivo desta espécie. Esta nova situação caracterizou a terceira etapa da carcinicultura brasileira (PLATAFORMA TECNOLÓGICA DO CAMARÃO, 2001).

A introdução e a utilização do *L. vannamei* em cultivos comerciais foi realmente um fator revolucionário para a carcinicultura brasileira. Em 2001, o contingente de mão de obra empregada na cadeia produtiva chegava a quase 60.000 pessoas. A produção nacional chegou a 40.000 ton, a área cultivada a 8.500 ha e a produtividade média a mais de 4.700,00 kg/ha/ano, colocando o Brasil como líder mundial em produtividade (BORGHETTI et al., 2003).

O desempenho do cultivo de camarão marinho no período 1998/2002 revelou cifras extraordinárias de crescimento. A produtividade média nacional cresceu de 1.680 kg/ha, em 1998, para 5.548 kg/ha, em 2002, posicionando o

Brasil em primeiro lugar entre todos os países produtores neste indicador de eficiência tecnológica (ROCHA; RODRIGUES, 2002).

A produção e a exportação do camarão cultivado no Brasil, em 2003, atingiram 90.190 ton e 58.455 ton, respectivamente, sendo referência de produção no Hemisfério Sul e ocupando o sexto lugar no “ranking” mundial, apresentando um crescimento de 50% em sua produção, quando comparado ao ano anterior (ROCHA; RODRIGUES, 2003).

Em 2004, a sustentabilidade desta atividade foi comprometida por uma série de fatores não apenas econômicos, mas também ambientais e sanitários que, juntos, contribuíram com uma queda na produção total de 15,84%, quando comparado ao ano anterior, com produtividade de 4.573 kg/ha/ano. (RODRIGUES, 2005).

Enquanto a carcinicultura mundial apresentou um crescimento de 40% entre os anos de 2003 a 2006, a produção e a exportação do camarão cultivado brasileiro apresentaram, no mesmo período, uma queda de 27,93% e 48,51%, respectivamente, chegando a apenas 65.000 ton de produção e 30.098 ton de exportações, em 2006 (ROCHA, 2007).

Segundo Rocha (2007), entre as principais causas que contribuíram para desconectar a carcinicultura brasileira da força motriz que vem impulsionando a carcinicultura mundial se destaca: a ação anti-dumping, as cheias de 2004, a contínua desvalorização do dólar (US\$) e a incidência das viroses da mionecrose infecciosa (NIM), na região nordeste e da mancha branca (WSS), na região sul. Na atualidade, a valorização da moeda brasileira e o aumento dos custos de produção superam todas as demais adversidades e

se constituem os principais entraves para a sustentabilidade econômica do setor, bem como, para a manutenção das exportações.

## **1.2. A problemática das doenças na carcinicultura**

Segundo Barracco; Perazolo; Rosa (2007), atualmente, o principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura em nível mundial consiste no controle de enfermidades.

Na carcinicultura, enfermidade significa qualquer alteração adversa na saúde ou no desempenho de camarões ou populações de camarões cultivados. As enfermidades são desencadeadas quando ocorre um desequilíbrio entre as condições ambientais do viveiro, o estado de saúde dos camarões cultivados e os agentes potencialmente patogênicos. As enfermidades infecciosas são causadas por patógenos transmissíveis (vírus, bactérias, protozoários e fungos), enquanto as não infecciosas são resultantes de agentes abióticos (efeitos nutricionais, genéticos, ambientais e físicos). Sob situação de desequilíbrio no ambiente de cultivo ou de manejo inadequado, os camarões são submetidos à ação de agentes estressantes, propiciando uma alteração na sua capacidade imunológica. Nestas circunstâncias a população cultivada pode sofrer um ataque de patógenos levando os indivíduos à debilitação ou à morte (NUNES; MARTINS, 2003).

Muitos fatores ambientais podem se caracterizar como agentes estressantes e desencadear uma condição favorável à instalação de um processo infeccioso nos camarões. Temperaturas e pH extremos, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, mudanças abruptas na salinidade e

presença de substâncias tóxicas, são agentes estressantes potenciais, associados ao desequilíbrio no ambiente e a baixa qualidade da água. A captação de água contaminada, a aquisição de pós-larvas com elevada carga viral, ou de baixa qualidade nutricional e a presença excessiva de outros organismos (dinoflagelados e cianofíceas) no ambiente de cultivo também podem gerar enfermidades nos camarões (SOULAP, 1999).

Além disso, as altas densidades de estocagem e a presença de grande quantidade de alimento vivo e de dejetos dos organismos eleva os níveis de matéria orgânica (VADSTEIN et al., 1993) eutrofizando o ambiente, o que tende a desestabilizar a comunidade bacteriana (ANDREWS; HARRIS, 1986) e a causar a seleção de patógenos oportunistas (*Vibrio* spp. e *Aeromonas* spp.) e a proliferação de protozoários (*Zoothamnium* spp. e gregarinas) (SOULAP, 1999). Smith et al. (2003) alertam que as reestocagens sucessivas dos viveiros, desrespeitando procedimentos adequados de desinfecção, podem levar ao acúmulo destes patógenos e bactérias oportunistas na água e no sedimento dos mesmos, bem como nas regiões adjacentes à fazenda.

De acordo com Nunes e Martins (2003), as enfermidades na carcinicultura são classificadas sob três níveis, baseando-se no nível de patogenicidade e risco para a indústria do camarão, sendo que a categoria C3 envolve os patógenos que causam um mínimo de impacto à produção, contudo podem gerar deformidades e alterações na aparência física dos camarões. Na categoria C2 estão os patógenos que causam ameaça à produção, podendo afetar a produtividade dos cultivos, o crescimento e a sobrevivência dos camarões. A categoria C1 inclui os patógenos que causam mortalidade em massa em populações, representando uma ameaça à sobrevivência da

indústria em uma determinada área geográfica. É nesta categoria que se encontram a maioria das doenças virais e bacterianas dos camarões marinhos.

Segundo Fegen e Clifford (2001), as doenças provocadas por vírus tem sido a causa mais importante de perdas econômicas na maioria dos países, sendo que o número de vírus causadores de doenças em camarões no ano de 1990 era um total de 6, número este que duplicou em 1992 e atingiu um total de 16 em 2001.

Dentro das doenças viróticas mais comuns e importantes no cultivo de camarão marinho podem-se mencionar aquelas causadas pelo: vírus da Necrose Hipodérmica e Hepatopancreática Infecciosa (IHHN), vírus da síndrome de Taura (TS), vírus da síndrome da Mancha Branca (WSS), vírus da Mionecrose Infecciosa (NIM), Doença da Cabeça Amarela (YHD) e outras vibrioses sem classificação definida.

A NIM foi inicialmente localizada no Piauí em 2002. Entre 2003 e 2004 ela se disseminou pelos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, sendo estimado em cerca de 20 milhões de dólares as perdas causadas pela doença, em 2003 (OIE, 2006). No início de 2004, a origem viral da doença foi confirmada por Donald Lightner através de microscopia eletrônica e análise genômica (NUNES et al., 2004). Apesar de indícios da doença em outros países criadores de *L. vannamei*, o registro da NIM ficou restrito ao nordeste brasileiro até 2006 quando sua presença também foi confirmada na Indonésia por Donald Lightner (SENAPIN et al., 2007).

A susceptibilidade do hospedeiro à doença viral, no caso dos vertebrados, depende de fatores hormonais e genéticos, como a presença de receptores nas células para o vírus, além de fatores não-genéticos, como o

estresse e a produção de radicais livres, que causam dano celular aumentando sua susceptibilidade (FLINT et al., 2000).

Segundo Barracco; Perazzolo; Rosa (2007), no momento presente, a profilaxia e o controle de doenças na carcinicultura restringem-se basicamente a práticas adequadas de manejo e à redução das condições de estresse, uma vez que os fatores que determinam o estado de saúde dos camarões são ainda pouco conhecidos.

Entre as práticas utilizadas no combate de doenças estão: profilaxia sanitária, desinfecção, quimioterapia, com ênfase ao uso de antibióticos, probióticos e vacinas contra doenças específicas, no caso de vertebrados. Entretanto, o uso indiscriminado de medicamentos, como antibióticos, e de substâncias químicas na aquicultura, apresenta implicações negativas, como aumento da resistência bacteriana e acúmulo de resíduos nos tecidos dos animais, que servirão para o consumo humano, e no meio ambiente (COOK et al., 2002; TORO, 2005).

Já o estresse, pode ser minimizado através da redução da densidade populacional, do controle da qualidade da água e de ações a nível administrativo, higiênico e nutricional (VAN DE BRAAK, 2002).

Diferente das espécies terrestres, o conhecimento relativo às enfermidades de animais aquáticos é ainda limitado. Além disso, a sensibilidade dos diferentes métodos de diagnóstico não foi ainda suficientemente estudada e há pouca capacidade de erradicação das enfermidades. Conseqüentemente, programas de prevenção e controle de enfermidades tornam-se de fundamental importância a nível mundial, de modo a manter o cultivo de camarões marinhos como uma atividade ecológica e

economicamente sustentável (BACHÈRE, 2000; RODRIGUEZ; MOULLAC, 2000).

Tendo em vista que o surgimento dessas doenças vem causando um grande impacto nas produções de camarão, tanto a nível mundial, como nacional, estratégias que visem tornar estes animais mais resistentes às enfermidades são muito importantes (RODRIGUES, 2006). Neste contexto, o estudo do sistema imune de crustáceos desponta como uma estratégia recente e promissora, visto que permite conhecer as bases da susceptibilidade e resistência destes animais a microrganismos patogênicos e parasitas, além de fornecer subsídios valiosos para o estabelecimento de parâmetros de saúde e imunomarcadores para seleção genética de animais mais resistentes a infecções (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2007).

### **1.3. Influência do estresse no desempenho do camarão cultivado**

Os diversos tipos de agentes estressantes que podem ser encontrados em um cultivo de camarão marinho podem ser potentes imunossupressores para os animais (BARBIERI; OSTRENSKY, 2001), cuja ocorrência pode afetar a qualidade do produto final de duas formas: primeiro, provocando alterações bioquímicas no camarão, que irão favorecer o surgimento de necroses e melanose; e segundo, ocasionando a manifestação de doenças que podem provocar a rejeição do produto por parte do consumidor, bem como a presença de sinais clínicos que denigrem o aspecto dos camarões, deixando-os deformados, opacos, mutilados e/ou manchados (CARVALHO, 2005).

O estresse provoca o declínio das defesas naturais dos camarões, deixando-os enfraquecidos e sujeitos às infecções, até mesmo por microorganismos patógenos oportunistas, como é o caso de bactérias do gênero *Vibrio spp.* ou *Pseudomonas spp.*, que são representantes do grupo das gram-negativas (SMITH et al., 2003; SANTOS, 2005).

Segundo Soulap (1999), essas bactérias habitam a matéria orgânica acumulada nos sedimentos e na coluna da água dos viveiros, fazendo parte da flora natural, como microorganismos decompositores. Em situações de desequilíbrio, elas podem se tornar patógenos potenciais para os camarões, devido ao enfraquecimento destes. Essas bactérias são apontadas como a principal fonte de contaminação nos viveiros, abrindo as portas para outros tipos de enfermidades mais severas e colocando em risco toda a atividade (SANTOS, 2005).

A observação de animais sofrendo algum tipo de estresse e apresentando sintomas de alterações fisiológicas, como comportamento letárgico, corpo em forma de “grampo”, estrias ou opacidade do músculo, também estão associadas a variações ambientais ou de qualidade de água, provocadas principalmente pelas mudanças bruscas de clima e pluviometria elevada. Essas variações acarretam alterações na composição iônica da água de cultivo e exigem um maior gasto de energia por parte do organismo do camarão para a realização da regulação osmótica adequada. Isto tudo, debilita os animais, propiciando a infecção destes por agentes patogênicos (SANTOS, 2005).

Vários outros fatores também podem levar a população de camarões ao estresse profundo deixando-os sujeitos a toda sorte de contaminação por



microorganismos patogênicos, presentes na água e nos sedimentos dos viveiros. Dentre eles podem ser citados: altas densidades de estocagem, concentração excessiva de alimento vivo nos viveiros, baixa qualidade nutricional, transporte e manuseio inadequados e quedas crônicas de oxigênio dissolvido, na água dos viveiros, durante a madrugada, ocasionadas pela deficiência de aeradores (VANDSTEIN et al., 1993; SMITH et al., 2003; SANTOS, 2005).

#### **1.4. Uso de medicamentos químicos na carcinicultura**

Segundo WAKSMAN (1942), os antibióticos podem ser classificados como substâncias muito dessemelhantes entre si quimicamente, produzidos originalmente pelo metabolismo de certas espécies de fungos (griseofulvina, penicilina), bactérias (polimixina B, bacitracina), *microspora* (gentamicina) e *streptomices* (estreptomicina), tendo como propriedade comum a atividade bactericida (inativação de todos os microorganismos, mas não necessariamente de seus esporos) ou bacteriostática (controle do crescimento bacteriano, sem mata-las). Os antibióticos podem se classificados como de largo espectro, que são ativos para um grande número de microorganismos, ou de curto espectro, que são específicos para um determinado grupo de microorganismos, interferindo diretamente nos seus processos metabólicos (BARBIERI; OSTRENSKY, 2001).

Em função da ocorrência de um grande número de infecções bacterianas, especialmente as causadas por *Vibrio spp.*, tanto durante a larvicultura, quanto na engorda de camarões, o uso indiscriminado de

antibióticos se popularizou em várias regiões do mundo, com sérias e negativas conseqüências ambientais e econômicas, não sendo atualmente recomendados.

Em muitos casos, o tratamento com antibiótico acontece mesmo na ausência de um trabalho de diagnose, ou seja, de identificação do problema que está afetando o sistema, sendo também aplicados em baixas concentrações como “medida preventiva” para o controle de bactérias (TORO, 2005). Apesar dessas estratégias de manejo costumarem funcionar em primeira instância, elas acabam levando consigo um enorme potencial para o desenvolvimento de inóculos bacterianos resistentes no sistema de cultivo (BARBIERI; OSTRENSKY, 2001).

Segundo Toro (2005), a resistência a drogas antimicrobianas tem sido um problema freqüente nos laboratórios de camarões marinhos, particularmente em sistemas de cultivos em que certos tipos de componentes, como antibióticos, são aplicados rotineira e indiscriminadamente. Com isso, novas cepas surgiram ao longo do tempo e muitos destes patógenos se tornaram mais resistentes, aumentando a mortalidade dos animais cultivados na indústria de carcinicultura (MACMILLAN, 2003).

Dentre os aspectos que devem ser considerados em relação à carcinicultura e o uso de antibióticos estão os resíduos de antibióticos no camarão, e no meio ambiente. Muitos dos compostos utilizados na aqüicultura não são metabolizados, sendo descarregados diretamente na água, sem prévio tratamento, tendo conseqüências diretas no meio ambiente (KÜMMERER, 2004). Este tipo de contaminação provoca mortalidade de diversos organismos nos ambientes de descarga, causando mudanças na composição e diversidade

das comunidades naturais, em especial as bentônicas (XUAN LE; MUNEKAGE, 2004).

Bjoerklund et al. (1990) afirma que em ambientes bem oxigenados, a vida média de alguns antibióticos e vitaminas varia de menos de uma semana na água, e entre 32-64 dias no sedimento. Já em ambientes anóxicos, como encontrados nos manguezais, alguns antibióticos podem resistir por até 419 dias. Com tal meia-vida, os antibióticos podem ser bioacumulados, atingindo o homem através da cadeia alimentar, ou podem causar resistência em patógenos destes mesmos organismos, com possibilidade de transferência da resistência a patógenos humanos (DIXON, 1991).

O uso de medicamentos e elementos químicos como os antibióticos são recursos que pelas implicações negativas inerentes na saúde humana e meio ambiente, ficaram relegados como prática comum na aquicultura.

Além disso, as doenças causadas por vírus, classificadas como um dos principais problemas enfrentados pela carcinicultura, não podem ser tratadas com antibióticos, não existindo, até o momento, medicamentos capazes de impedir e/ou eliminar as infecções virais nos camarões (BARBIERI; OSTRESKY, 2002). Sendo assim, cada vez mais aumenta a procura de estratégias alternativas que visem a prevenção e/ou erradicação das enfermidades, sem o uso de antibióticos, na carcinicultura. Neste contexto, uso de substâncias capazes de aumentar a imunocompetência dos camarões, em paralelo a um bom manejo do cultivo, desponta certamente como uma ferramenta promissora na busca de uma maior proteção imunológica contra a instalação de infecções no ambiente de cultivo (BARRACCO; PERAZOLLO; ROSA, 2007).

### **1.5. Algumas considerações sobre o sistema imunológico dos crustáceos**

O sistema imunológico compreende todos os mecanismos pelos quais um organismo multicelular se defende de invasores externos, como bactérias, fungos, vírus ou parasitas. Qualquer resposta imune envolve, primeiramente, o reconhecimento do antígeno, quer seja um organismo agressor (patógeno) ou outro material estranho e, em segundo lugar, a elaboração de uma reação direcionada a este elemento, com a finalidade de eliminá-lo do organismo. De uma maneira geral, existem duas categorias de resposta imune: a inata ou não-específica e a adaptativa ou específica (ABBAS; LITCHMAN, 2005).

Segundo Barracco; Perazzolo; Rosa (2007), o sistema imune inato é filogeneticamente mais antigo e considerado mais simples, sendo encontrado em todos organismos multicelulares, como animais invertebrados e vertebrados. Já o adaptativo, altamente complexo e eficiente, é mais recente e ocorre apenas nos vertebrados. Este se caracteriza pela presença de uma infinidade de receptores celulares e anticorpos específicos e ainda por células de memória de linhagem linfocítica, que garantem uma resposta de defesa lenta, eficiente e altamente específica. De acordo com SMITH et al., (2003), a ausência de uma imunidade adquirida nos invertebrados inviabiliza qualquer tentativa de desenvolver vacinas, na concepção clássica do termo, diminuindo assim, de forma substancial, a possibilidade de se prevenir e controlar doenças nestes animais.

A integridade corpórea dos crustáceos, além da sua cutícula, que funciona como uma barreira física protetora contra agressões e invasão de patógenos, é mantida por seu sistema imunológico que, assim como outros

invertebrados, conta apenas com seu sistema imune inato (VAN DE BRAAK, 2002).

Nos crustáceos a resposta imune se apresenta em duas fases: uma imediata não induzível, associada a fatores celulares e uma induzida ou humoral, caracterizada pela participação das proteínas plasmáticas e fatores microbicidas circulantes que melhoram a eficiência da resposta imune (SÖDERHÄLL, 1997). As reações celulares e humorais atuam de forma integrada em crustáceos, protegendo-os da invasão de microrganismos e parasitas, garantindo assim sua integridade corpórea (BARRACCO; PERAZOLLO; ROSA, 2007).

As respostas imune celulares dos crustáceos estão basicamente relacionada às células da hemolinfa, ou hemócitos, e incluem a fagocitose de microrganismos, a formação de nódulos e cápsulas celulares em torno de partículas estranhas e os mecanismos microbicidas e/ou citotóxicos utilizados por estas células para lisar e degradar patógenos invasores.

A compreensão das reações imune celulares dos crustáceos depende de forma crucial da identificação e caracterização das suas células imunocompetentes, ou hemócitos (BARRACCO; PERAZOLLO; ROSA, 2007). Segundo Bachère et al. (2004), três tipos de hemócitos são identificados em invertebrados, de acordo com a presença de grânulos citoplasmáticos; hialino ou agranular, semigranular (com pequenos grânulos) e granular (com grânulos maiores). As células hialinas estariam envolvidas na coagulação, enquanto as semigranulares na encapsulação e nodulação e também, em conjunto com as granulares, participariam na fagocitose, citotoxicidade e produção de peptídeos antimicrobianos (BARLETT et al., 2002).

A fagocitose é a defesa celular mais comum e, junto com os fatores humorais, constituem a primeira linha de defesa, uma vez que determinado patógeno ultrapasse a barreira física da cutícula (BAYNE, 1990). Este processo consiste no reconhecimento, ingestão e degradação, através de vários mecanismos microbicidas, de partículas estranhas como bactérias, esporos e células envelhecidas do próprio organismo (VÁZQUEZ et al., 1998).

Já a formação de nódulos e cápsulas ocorre, respectivamente, quando a cavidade corpórea dos crustáceos é invadida por uma quantidade maciça de microrganismos ou quando as partículas invasoras são muito grandes, não sendo possível sua fagocitose (BAYNE, 1990). Tanto os nódulos como cápsulas apresentam, geralmente, uma pigmentação escura, denominada melanização, na região central próximo aos microrganismos agregados ou parasitos encapsulados. Em ambas as estruturas, os patógenos são destruídos pela liberação de moléculas citotóxicas ou líticas. A melanização também pode ser observada durante a cicatrização de ferimentos, onde a coagulação da hemolinfa e a migração dos hemócitos ao local da injúria permitem a formação de um tampão celular até que uma nova cutícula seja reconstituída (BARRACCO; PERAZOLLO; ROSA, 2007).

A biossíntese da melanina é um processo complexo, iniciando-se com a oxidação de compostos fenólicos para quinonas, através da enzima fenoloxidase (PO) (BARRACCO; PERAZOLLO; ROSA, 2007). As quinonas, por sua vez, continuam transformando-se por via não enzimática em vários outros compostos, que culminam na formação de melanina. A PO é sintetizada pelos hemócitos como uma forma inativa e é convertida na sua forma ativa, pró-fenoloxidase (proPO), por uma cascata proteolítica, denominada sistema de

ativação da proPO (VAN DE BRAAK, 2002). A ativação deste sistema pode ser desencadeada por componentes da superfície de microrganismos, o que sugere que esteja relacionado ao reconhecimento do não próprio em muitos invertebrados (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1998).

Nos crustáceos, o sistema de ativação da proPO e outras moléculas associadas encontram-se compartimentalizados no interior dos grânulos dos hemócitos, de onde são liberados por uma exocitose regulada. No entanto, deve ser ressaltado que, junto desta exocitose, ocorre também à liberação de moléculas altamente tóxicas, como as quinonas, hemiquinonas e espécies ativas de oxigênio (EAO), que atuando em sinergismo no espaço extracelular, culminam com a destruição dos microrganismos e/ou parasitos invasores (BARRACCO; PERAZOLLO; ROSA, 2007). Já a melanina, parece funcionar como *scavenger* de radicais livres (NAPPI; VASS, 1993; NAPPI; OTTAVIANI, 2000), minimizando assim os efeitos deletérios destas moléculas altamente tóxicas para o organismo do hospedeiro. Contudo, deve ser salientado que a melanina não é a molécula imunoefetora mais importante durante a ativação do sistema proPO, sendo os compostos citotóxicos intermediários os mais efetivos (NAPPI; VASS, 1993). Assim sendo, a melanização representa, mais especificamente, o final de um potente processo imunoefetor.

Segundo Muñoz et al. (2000), as EAO são moléculas citotóxicas produzidas durante as reações imune celulares, como na fagocitose. A produção destas moléculas é acompanhada de um importante aumento do consumo de oxigênio, fenômeno conhecido de “burst” respiratório, que resulta na inibição do crescimento ou na completa destruição dos microrganismos invasores. Estas moléculas possuem propriedades altamente reativas, capazes

de reagir com qualquer composto que esteja próximo, podendo funcionar como agentes microbicidas potentes, podendo até provocar danos celulares aos próprios fagócitos. Para neutralizar este efeito existem mecanismos de defesa antioxidantes, que podem ser tanto enzimáticos como não enzimáticos, atuando na eliminação das EAO ou mesmo na transformação destas em produtos menos tóxicos (CÓRDOBA et al, 2005). A ação de compostos antioxidantes de origem exógena, como o ácido ascórbico (vitamina C), a glutatona e o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), também podem interagir diretamente com os radicais livres neutralizando-os (WARNER, 1994).

Apesar de não possuírem moléculas de reconhecimento altamente específicas ou anticorpos, os invertebrados contam com outros tipos de proteínas, chamadas de proteínas de reconhecimento-padrão (PRPs) que, apesar de menos específicas, também são capazes de reconhecer eficientemente, desencadear e amplificar a resposta imune contra uma variedade de invasores (BARRACCO; PERAZOLLO; ROSA, 2007).

As PRPs são moléculas produzidas pelo hospedeiro, secretadas para o plasma ou localizadas na superfície das células, principalmente as do sistema imune, que reconhecem e se ligam aos padrões moleculares presentes especificamente nos microrganismos (PAMPs). Em invertebrados, os principais PAMPs reconhecidos por PRPs são os lipopolissacarídeos (LPS) da superfície das bactérias Gram-negativas e as peptidoglicanas (PGs) da parede das Gram-positivas e as  $\beta$ -1,3-glicanas da parede de fungos (Lee e Söderhäll, 2002). Uma vez dentro do hospedeiro, os PAMPs são reconhecidos e ligados às suas respectivas PRPs e, no caso dos crustáceos, iniciam a ativação principalmente dos hemócitos, desencadeando uma resposta imune-celular ou à produção de



uma série de moléculas imunoreguladoras por degranulação (BARRACCO; PERAZOLLO; ROSA, 2007).

O reconhecimento do não-próprio em crustáceos, além do sistema de ativação da proPO, pode ser realizado pelas lectinas e pelo sistema de coagulação (BARRACCO; PERAZOLLO; ROSA, 2007).

As lectinas são proteínas que possuem a propriedade de reconhecer, de maneira específica, açúcares presentes na parede da célula microbiana, tais como lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e  $\beta$ -glicanaproteínas, causando sua aglutinação (VÁZQUEZ et al., 1998). Esta propriedade se deve ao fato destas moléculas possuírem pelo menos dois sítios de ligação, sendo assim capazes de aglutinar células que expressem determinados açúcares na sua superfície. Além da propriedade de aglutinação, algumas lectinas podem ainda aumentar a atividade de fagocitose dos microrganismos com os quais reagem, funcionando como opsoninas, isto é, proteínas que recobrem as bactérias tornando-as mais fagocitáveis (BAYNE, 1990).

Uma coagulação rápida e eficiente da hemolinfa é considerada como um importante mecanismo de defesa em crustáceos, o qual evita a perda excessiva de hemolinfa durante injúrias, impede a invasão de microrganismos do ambiente aquático e auxilia na ativação dos hemócitos (VAN DE BRAAK, 2002). Os crustáceos apresentam um sistema de coagulação distinto em que a polimerização das proteínas de coagulação se dá através de enzimas transglutinasas (TGase) dependentes de cálcio. A reação de coagulação se inicia quando a TGase é liberada dos hemócitos, promovendo a polimerização da proteína de coagulação presente no plasma, formando um gel insolúvel (YEH et al., 1998).

## **1.6. Uso de substâncias potencialmente imunoestimulantes na carcinicultura**

Os crustáceos, assim como outros invertebrados, contam apenas com o sistema imune inato, o que não permite o desenvolvimento de vacinas específicas para prevenir e controlar infecções (BARRACCO; PERAZOLLO; ROSA, 2007). Com isso, o uso indiscriminado de antibióticos na carcinicultura se tornou uma prática comum em várias regiões do mundo, trazendo conseqüências ambientais e econômicas desastrosas (BARBIERI; OSTRENSKY, 2002). Sendo assim, a procura por estratégias alternativas que visem à prevenção ou a erradicação das enfermidades, sem o uso de antibióticos, tornou-se cada vez mais importante na carcinicultura (SMITH et al., 2003).

Uma opção que vem sendo muito estudada nos últimos anos é o uso de compostos imunoestimulantes. A imunoestimulação em crustáceos é de origem profilática, promovendo uma ação no sistema imune não específico, aumentando a resistência do hospedeiro contra doenças que, na maioria das circunstâncias, são causadas por patógenos (RAA, 2000).

Nos últimos anos, vários compostos imunoestimulantes vêm sendo testados com sucesso, apresentando resultados promissores na sobrevivência de crustáceos expostos, posteriormente, a microrganismos patogênicos. Dentre estes compostos, muitos são derivados de microrganismos ou de algas, destacando-se os componentes da parede celular de diferentes bactérias, fungos, micro e macroalgas. Os principais princípios ativos destes componentes, capazes de gerar uma imunoestimulação são: fragmentos de

peptidoglicanas (PGs), lipopolissacarídeos (LPS), lipopeptídeos, polissacarídeos sulfatados,  $\beta$ -glicanas, aciloligopeptídeos e peptídeos bacterianos específicos (SONG; HUANG, 2000).

Berger (2000) acredita que os compostos moduladores do sistema imunológico de crustáceos apresentam grande potencial em relação aos antibióticos, pois possuem uma série de vantagens como: ausência de toxicidade ou residualidade, não causar dependência, facilidade de dosagem e administração, baixo custo comparativo e, principalmente, por não ocasionarem impactos negativos ao meio ambiente e ao consumidor.

Segundo Smith et al. (2003), os imunoestimulantes podem ser administrados através de injeção, imersão e como complemento alimentar, adicionados à ração. A injeção é considerada a estratégia mais eficiente de aplicação. Entretanto, este método além de ser impraticável em larga escala, requer um tamanho mínimo para aplicação e pode causar um estresse adicional aos indivíduos. Já os métodos de imersão e incorporação na ração são considerados mais adequados, pois são de fácil aplicação, podem ser administrado em grandes quantidades de indivíduos, independente do seu tamanho, não interferem na rotina da fazenda e não causam estresse nos indivíduos. Entretanto, a imersão não é eficaz para todos os tipos de doenças e requer grandes quantidades do composto. Sendo assim, a incorporação na ração é o método que vem sendo mais indicado para aqüicultura (VAN DE BRAAK, 2002; BRICKNELL; DALMO, 2005).

A dose ideal e o período de aplicação dos compostos imunoestimulantes é uma questão de extrema importância para obtenção de resultados

satisfatórios no aumento da resposta imune e na proteção contra organismos patógenos (SAKAI, 1999).

Porém, a utilização de dosagens muito altas ou em momentos inadequados pode causar toxicidade ou inibição das respostas imunológicas, principalmente quando aplicadas por períodos muito longos (SMITH et al., 2003; HAUTON; SMITH, 2004). De acordo com Bricknell e Dalmo (2005) a exposição contínua ao imunoestimulantes pode ainda induzir a tolerância ao composto.

Raa (2000) relata que o uso de imunoestimulantes durante estágios avançados de infecção pode agravar os sintomas da doença, pois o composto pode ser reconhecido pelo organismo como um novo agente infectante. Segundo o Boletim Informativo do Cenaim (2001), a administração de uma dosagem incorreta pode também resultar na formação inadequada da pré-muda em crustáceos.

Raa (2000) sugere que os imunoestimulantes, para peixes e crustáceos, sejam utilizados em três ocasiões distintas: a) quando os indivíduos forem submetidos a situações conhecidas de estresse, como: manuseio, transporte, biometria, aclimatação, introdução à alimentação artificial; b) durante exposições esperadas a microrganismos e parasitas, como: “blooms” de primavera e outono em ambientes marinhos e altas densidades de estocagem; e c) estágio de desenvolvimento larval, fase em que o animal está particularmente mais susceptível a agentes infecciosos.

Segundo Vargas-Albores (2002), 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 imunoestimulantes devido à má nutrição ou ao comprometimento fisiológico com outros processos como, muda e reprodução.

Deve ainda ser claramente observado, segundo Barracco; Perazollo; Rosa (2007), que a busca de uma ativação das respostas imunológicas no camarão tratado com imunoestimulantes não é desejável, como forma de prevenir infecções. O que se busca de fato no cultivo de camarões não é um sistema imunológico continuamente ativado, e sim um estado de maior imunocompetência dos animais, que lhes proporcione uma maior capacidade e rapidez de resposta imunológica por ocasião de uma invasão por patógenos.

### **1.7. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas como fonte de imunoestimulantes**

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 então denominados de polissacarídeos sulfatados (PS). Por definição, os PS são polímeros formados por unidades repetitivas de açúcares e

carregados negativamente devido à presença de radicais sulfato (STYER, 1996).

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

As algas marinhas são juntamente com as gramíneas marinhas os únicos vegetais conhecidos por apresentarem polissacarídeos sulfatados em sua composição (PAINTER, 1983; AQUINO et al, 2005). Os PS são encontrados em micro e macroalgas marinhas, de uma maneira geral, na parede celular como dois componentes: fibrilar e amorfo. O primeiro é responsável pela forma da estrutura da parede celular, enquanto o segundo, dá origem à matriz celular, na qual todo componente fibrilar encontra-se banhado (PAINTE, 1983).

As algas marinhas abrangem um vasto grupo do reino vegetal, sendo classificadas, de acordo com suas características fisiológicas e morfológicas, em Chlorophyta, algas verdes, Rhodophyta, algas vermelhas, e Phaeophyta, algas marrons ou pardas (BARNES, 1980).

Segundo Percival e McDowel (1967), os polissacarídeos sulfatados estão presentes nas algas pardas, vermelhas e verdes na forma de fucanas, galactanas e arabino-galactanas, respectivamente.

Nos últimos anos, muitos estudos vêm sendo realizados mostrando o efeito imunoestimulante, tanto em peixes como em camarões, de polissacarídeos sulfatados de micro e macro algas marinhas.

A imersão de juvenis de camarão branco *L. vannamei* em soluções de  $\beta$ -glicana e de PS, extraído de uma microalga cianofícia, 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, o PS foi utilizado em uma dosagem 500 vezes menor do que o outro composto testado (CAMPA-CÓRDOVA et al., 2002).

Lee et al. (2003) reportaram um aumento na atividade fagocítica dos hemócitos do camarão *Penaeus merguensis*, através da incorporação dos PS da microalga *Spirulina platensis* na dieta, após a exposição às bactérias: *Vibrio harveyi*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Bacillus subtilis*.

Takahashi et al. (1998) demonstraram a eficácia da administração oral de fucoidan, extraído da alga marinha parda *Cladosiphon okamuranus*, nas concentrações 60 e 100 mg/kg de camarão/dia, no controle do WSSV em *Marsupenaeus japonicus*. Os resultados mostram sobrevivência de 77% e 76%, respectivamente, enquanto os indivíduos do tratamento controle apresentaram 100% de mortalidade.

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

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 causador da NIM (COSTA et al., 2006), sendo observado, em ambos os casos, um aumento significativo da sobrevivência dos indivíduos.

Huang et al. (2006) avaliaram o uso oral do extrato bruto obtido da alga marinha parda *Sargassum fusiforme*. Os resultados mostraram que, após 30 dias, os camarões *Fenneropenaeus chinensis*, infectados com *Vibrio harveyi*, se tornaram mais resistentes ao patógeno, apresentando maiores sobrevivências médias, em relação aos organismos do tratamento controle.

Yeh et al. (2006) determinaram o número total de hemócitos, a atividade da proPO e as ROIs de camarões *L. vannamei*, infectados pelo *V. alginolyticus*, após administrados, via imersão (100, 300 e 500 mg.L<sup>-1</sup>) ou injeção (2, 6, 10 e 20 µg g<sup>-1</sup>), com extrato de água quente da alga parda *Sargassum duplicatum*. Todos os parâmetros testados aumentaram significativamente quando os camarões foram imersos em 300 mg.L<sup>-1</sup> ou quando injetados com 10 µg g<sup>-1</sup> do extrato, elevando significativamente sua habilidade imunitária e a resistência contra infecção ao *V. alginolyticus*.

Fu et al. (2007) testaram os efeitos imunoestimulatórios e as respostas contra o *V. alginolyticus*, do extrato de água quente da alga vermelha *Gelidium amansii* via imersão, injeção e incorporados à ração, no camarão branco *L. vannamei*. Tanto o número total de hemócitos, como a atividade da proPO, bem como o “burst” respiratório aumentaram significativamente nos três métodos de administração testados, sugerindo a habilidade do composto em elevar a imunidade e a resistência contra infecção do *V. alginolyticus*.

Como é possível observar, parece existir uma forte correlação entre a imunoestimulação e o aumento da resistência contra as infecções causadas por bactérias e vírus ou por situações de estresse, em camarões (SAKAI, 1999). Desta forma, a imunoestimulação, aliada a um bom manejo ambiental,



poderia contribuir de maneira significativa para a reestruturação do setor da carcinicultura no Brasil e no mundo.

### **1.8. Outras atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas**

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 biotecnologia. Dentre estes compostos, os PS extraídos de algas marinhas podem ser destacado por apresentarem diversas atividades biológicas, tais como: anti-inflamatória, pró-inflamatória, anti-tumoral, anti-metástica, anti-proliferativa, antiviral, anticoagulante e antitrombótica (BOISSON-VIDAL et al., 1995), sendo as três últimas as mais estudadas.

Os PS da alga marinha verde *Ulva perfusa* foram utilizados em testes de atividade anti-hiperlipidêmica. Após a degradação, duas frações de baixo peso molecular foram administradas por 21 dias na dieta de ratos. Os resultados indicam que esses polímeros, com diferentes pesos moleculares, diminuíram os níveis de lipídios desses animais (YU et al., 2003).

Ângulo e Lomonte (2003) relataram que o fucoidam extraído da alga marinha parda *Fucus vesiculosus*, apresentou eficiente atividade citotóxica e miotóxica contra o veneno das serpentes *Bothrops asper*, *Cerrophidion godmani*, *Atropoides nummifer* e *Bothriechis aqchlegelii*.

Segundo Zhou et al. (2004), a alga vermelha *Chondrus ocellatus* possui galactanas sulfatadas com atividade antitumoral. Esses polissacarídeos foram

degradados em frações com diferentes pesos moleculares, sendo que todas apresentando atividade antitumoral em menor ou maior grau.

As galactanas sulfatadas das macroalgas vermelhas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulares* apresentaram atividade antiviral contra o vírus do herpes simples tipos I e II. O mecanismo de ação está relacionado com a inibição da adsorção do vírus na célula-alvo. O mecanismo de ação está relacionado com a adsorção do vírus na célula-alvo. Além disso, essas galactanas foram eficientes em evitar a infecção viral do herpes tipo II a partir do uso tópico na vagina de roedores (TALARICO et al., 2004).

A fucana sulfatada extraída da alga parda *Laminaria cichorioides* apresentou uma potente atividade anticoagulante, *in vitro*, inibindo a ação da trombina pelo cofactor II da heparina. Este PS também acelerou a inibição da trombina e do fator Xa via antitrombina, entretanto com menor intensidade. (YOON et al., 2007).

Chattopadhyay et al. (2007) analisaram a atividade antiviral e anticoagulante do extrato bruto e das frações, obtidas por cromatografia de troca iônica, da alga vermelha *Grateloupia indica*. Tanto o extrato bruto quanto a fração F3 apresentaram potente atividade anti-HSV (herpes simplex vírus), porém baixa atividade anticoagulante.

Nair et al. (2007) investigaram a atividade antimicrobiana de vinte e seis extratos de PS de algas marinhas, contra cinco importantes bactérias: *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas testosterone*. As bactérias mostraram respostas variadas para os diferentes PS de algas. Dentre os extratos analisados, o da alga verde *Enteromorpha intestinalis* foi considerado o mais potente, sendo *K.*

*pneumoniae* a bactéria mais suscetível, enquanto *M. flavus* e *C. freundii* foram as mais resistentes.

Venkateswarlu et al. (2007) verificaram, em testes *in vitro*, que os metabólitos produzidos pela alga marinha parda *Spatoglossum variabile* foram ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de apresentaram significativa atividade antioxidante.

Dar et al. (2007) testou o efeito da variação sazonal na atividade anti-inflamatória do extrato da alga parda *Sargassum wightii*, em edemas induzidos nas patas de camundongos. Foi verificado que os extratos coletados no inverno apresentaram uma atividade significativamente maior, do que os coletados no verão. O autor explica esta diferença à provável variação sazonal dos nutrientes disponíveis no ambiente, influenciando, dessa maneira, a síntese dos constituintes requeridos ao crescimento da alga.

Estudos com PS de algas 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).

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 acompanhado de perspectivas para a descoberta de um novo fármaco (ROCHA et al., 2004).

Apesar do potencial farmacológico dos polissacarídeos de algas, da diversidade de espécies das mesmas e, conseqüentemente, da quantidade de polissacarídeos sulfatados nelas encontrados, poucos estudos vêm sendo realizados visando o uso destes compostos na aqüicultura, para conferir aos animais uma melhor performance durante os cultivos.

### **1.9. Polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* e suas atividades biológicas**

As algas pardas contêm uma ampla variedade de polissacarídeos ácidos, sendo alguns deles compostos exclusivamente por ácido urônico, como o ácido algínico, outros por fucose e sulfato, denominados homofucanas, e outros por xilose, fucose, manose, galactose, ácido glucurônico e sulfato, em diferentes proporções, chamados de heterofucanas (KLOAREG; QUATRANO, 1988).

Alginatos são polissacarídeos estruturais que ocorrem, naturalmente, nas algas marinhas pardas, compreendendo 40% de seu peso seco, sendo um termo coletivo usado para o ácido algínico, seus sais e derivados. O ácido algínico é um co-polissacarídeo de alto peso molecular, composto de duas unidades monoméricas de ácido  $\beta$ -D-manurônico e  $\alpha$ -L-gulurônico, em várias proporções, dependendo da espécie de alga (LAPASIN; PRICL, 1999).

Segundo Estervag e Valla (1997) cada espécie de alga parda sintetiza diferentes quantidades de alginatos, com estruturas distintas, o que está

diretamente relacionado com suas características estruturais como morfologia, rigidez, elasticidade e capacidade de retenção de água. Tal fato é explicado por estas se desenvolverem em locais e condições distintas, como profundidade, tempo de exposição ao sol, impacto das ondas, entre outras.

De acordo com Moe et al. (1995), os alginatos não têm valor nutricional e são utilizados como aditivos para melhorar, modificar e estabilizar a textura de certos alimentos. Propriedades importantes incluem a melhora da viscosidade, habilidade de formação de gel e estabilização de misturas aquosas, dispersões e emulsões. Algumas dessas propriedades são provenientes das próprias propriedades físicas inerentes aos alginatos, mas elas também podem ser resultado da interação desses com outros componentes do alimento, tais como proteínas, gorduras ou fibras.

Já o termo fucana é utilizado para definir a família de polissacarídeos sulfatados que contêm L-fucose, possuindo uma grande variabilidade de pesos moleculares (ROCHA et al. 2001). Estes polímeros são encontrados na matriz extracelular de algas marinhas pardas (PERCIVAL; ROSS, 1950), na camada gelatinosa dos ovos de ouriços do mar (MULLOY et al., 1994) e na parede celular de pepinos do mar (MOURÃO; BASTOS, 1987).

Nas algas pardas, a estrutura das fucanas pode variar de acordo com as espécies e, às vezes, entre as diferentes partes das mesmas (DIETRICH et al. 1995), como também com as estações do ano e as condições climáticas locais (VON HOLDT et al., 1955; HONYA et al., 1999). As fucanas de algas marinhas são, em geral, compostas de unidades de L-fucose em ligação  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 2) ou  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3)-4-O sulfatada, com ramificações de unidades de D-xilose, D-galactose, ácido D-glucurônico ou sulfato, nas posições 3 ou 2, sendo esta grande

heterogeneidade responsável pela dificuldade no fracionamento e caracterização destes polímeros (PATANKAR et al., 1993). Além disso, a estrutura das fucanas também pode variar de acordo com o método de extração (MABEAU et al., 1990). Desta maneira, cada nova fucana descrita possui características estruturais distintas e, com isso, um grande potencial farmacológico. Sendo assim, diversos modelos experimentais têm sido empregados como forma de avaliar as diversas atividades farmacológicas e a utilização destes compostos. Dentre as atividades biológicas já reportadas para PS de algas pardas estão: anticoagulante (MULLOY et al., 2000), antitrombótica (GRAUFFEL et al., 1989), antiviral (WANG et al. 2007), antiadesiva, (ROCHA et al., 2001), antiproliferativa (YUAN; WALSH, 2006), anti-inflamatória (JEONG et al. 2006), antitumoral (DIAS et al. 2005), antioxidante (CHO et al. 2007), entre outras.

A alga marinha parda *S. schroederi* (Fig. 1), pertencente à Ordem Dictyotales, se desenvolve em formações rochosas protegidas da Costa Atlântica Latino-Americana, podendo atingir de 10 a 30 cm de comprimento, apresentado ramificação repetidamente alternada, podendo ser sub-dicotômica, lobada ou ramificada, com as divisões irregulares de 0,5 a 2,5 cm de largura e 0,5 a 7,0 cm de distância entre bifurcações. (TAYLOR, 1960). O talo é fixado ao substrato por massa rizoidal, ereto, foliáceo em forma de fita larga (JOLY, 1967), com margens onduladas ou irregularmente dentadas (TAYLOR, 1960).



Figura 1: Exemplar da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*.

Um polissacarídeo ácido, de 21 kDa, contendo fucose, xilose, ácido glucurônico e sulfato, totalizando 20% dos polissacarídeos ácidos presentes na alga *S. schroederi*, foi purificado através de coluna de troca iônica e cromatografia molecular por Leite et al. (1998), sendo o primeiro trabalho a sugerir uma estrutura completa para esta xilofucoglucorona sulfatada. O polímero é composto por uma cadeia central formada por  $\beta$ -1-3-ácido glucurônico, contendo oligossacarídeos de 4,5 kDa, com ramificações no C-4 das cadeias de  $\alpha$ -fucose (1 $\rightarrow$ 3). A fucose é, na maioria das vezes, substituída por grupos sulfatos no C-4 e por  $\beta$ -xilose (1 $\rightarrow$ 4) no C-2.

Segundo Rocha (2001), a alga parda *Spatoglossum schroederi* produz três fucanas, denominadas de fucanas A, B e C.

A fucana A, isolada e purificada por Rocha (1998), é uma galactoxilofucana sulfatada. O composto apresenta um peso molecular médio de 15kDa, sendo constituído de fucose, xilose, galactose, sulfato e pequenas quantidades de ácido glucurônico, em relação molar de 1:0,55:1,9:2,3:0,15, respectivamente. O composto foi parcialmente degradado por glicosidases, produzindo galactose, xilose e fucose na mesma proporção molar, sugerindo a

presença de um esqueleto de galactana com ramificações de fucose sulfatada e xilose.

A fucana B é uma xilogalactofucana extraída e purificada através de precipitação em dois volumes de acetona e coluna de troca iônica, respectivamente. O polissacarídeo apresentou peso molecular de 24kDa, sendo formado por fucose, xilose, galactose e sulfato nas proporções 1:0,6:2:2,3, respectivamente (ROCHA et al., 2005a),

A fucana C, com peso molecular de 21,5 kDa, foi extraída por Rocha et al. (2005b) através de hidrólise enzimática e purificada por precipitação diferencial com acetona e cromatografias de troca iônica e gel filtração. As análises químicas, os estudos de metilação e de RMN indicaram as principais características estruturais deste polímero, o qual é constituído por fucose, xilose, galactose, sulfato (1:0,5:2:2) e traços de ácido urônico, sendo formada por uma estrutura central de  $\beta$ -D-galactose-3-sulfato, com aproximadamente 25% destas unidades contendo cadeias laterais formadas por oligossacarídeos  $\alpha$ -L-fucose-3-sulfato ou  $\alpha$ -L-fucose-3-sulfato (1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -D-xilose-3, ligados ao O-2 da cadeia central.

Apesar da grande disponibilidade da alga marinha parda *S. schroederi* em nosso litoral e da abundância e heterogeneidade dos PS presentes na espécie, o potencial farmacológico desta alga ainda está pouco explorado.

Paracer et al. (1987) demonstraram que o extrato de *S. schroederi*, em concentrado aquoso de 1,0 a 0,50%, obteve efeito direto sobre alguns gêneros de nematóides que atacam plantas, matando espécies de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. acrita* e *Hoplolaimus galeatus*.



Leite et al. (1998) e Rocha et al. (2005b) testaram as atividades anticoagulante, *in vitro*, e antitrombótica, em modelo experimental de trombose venosa em camundongos, da galactofucana sulfatada extraída da alga marinha parda *S. schroederi*. Embora este PS não tenha apresentado atividade anticoagulante, estimulou a síntese do heparan sulfato pelas células endoteliais, podendo estar relacionado com a atividade antitrombótica *in vivo*, sugerindo que esta galactofucana sulfatada talvez possa ser utilizada como uma potente droga antitrombótica.

Rocha et al. (2001) avaliaram a possível função inibidora das interações da matriz celular da fucana extraída da alga *S. schroederi*, utilizando células do ovário de Hamster chinês (CHO-K1) e o tipo mutante deficiente em xilosiltransferase (CHO-745). O tratamento com o polímero inibiu a adesão de várias proteínas específicas da matriz extracelular. Entretanto, apesar da inibição, a fucana não afetou a proliferação e o ciclo celular. De acordo com os resultados, este polímero pode ser considerado um novo composto anti-adesivo, com aplicações farmacológicas potenciais.

Araújo et al. (2004) testaram a xilofucoglucorona da alga *S. schroederi* como suporte para imobilização antibiótica. O autor concluiu que este polissacarídeo pode ser usado como antibacteriano, servindo como um suporte solúvel em água para imobilização de gentamicina e amikacina.

Segundo Texeira et al. (2007), o extrato cetônico da alga *S. schroederi* inibiu a atividade enzimática de  $\alpha$ -amilase, conferindo um potencial hipoglicêmico ao composto, podendo ser futuramente utilizado no controle da hiperglicemia.

Já Rocha et al. (2007) não encontraram nenhuma a atividade citotóxica *in vitro* contra o melanoma humano C32 do extrato bruto de *S. schroederi*.

Apesar do potencial farmacológico dos PS de *S. schroederi*, nenhum estudo foi até hoje realizado visando detectar a possível influência destes polímeros no desempenho de organismos aquáticos cultiváveis, visando melhores rendimentos na aqüicultura.

O presente estudo avaliou a administração, via imersão, dos PS da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*, no aumento da resistência do camarão *L. vannamei* submetidos a fatores ambientais potencialmente estressantes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Verificar o efeito dos polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*, no aumento da resistência de juvenis e pós-larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, submetidos a diferentes condições de estresse.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Extrair e fracionar os PS presentes na alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*;
2. Detectar a presença dos carboidratos totais presentes em cada fração coletada;
3. Determinar o perfil eletroforético dos PS presentes em cada extração;
4. Administrar os PS via imersão, por 33 dias, em três doses distintas, e avaliar a sobrevivência e o ganho de peso de juvenis de camarões submetidos à supressão temporária da aeração dos aquários;
5. Administrar os PS via imersão, por seis dias, em duas doses distintas, e avaliar a sobrevivência de PL's de camarão submetidas ao teste de estresse salino, imediatamente após o período de administração;

6. Repetir o teste de estresse salino uma semana após o encerramento da administração dos PS às PL's, buscando verificar um possível efeito prolongado do composto.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta e preparo da alga

A coleta das algas da espécie *S. schroederii* foi realizada na Praia do Pacheco, município de Caucaia, litoral oeste de Fortaleza - CE (Fig. 2 e 3). Em laboratório, as algas foram lavadas com água destilada, secas em estufa a 40 °C e cortadas em pequenos pedaços.



Figura 2: Praia do Pacheco, litoral oeste de Fortaleza - CE.



Figura 3: Mesolitoral rochoso da Praia do Pacheco, local de coleta das algas.

#### 3.2. Extração dos polissacarídeos sulfatados

Cerca de 5 g da alga seca foram hidratadas com 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 contendo 5 mM de EDTA e 5 mM de cisteína. Em seguida, o material foi submetido à digestão proteolítica através da adição de 17 mL de uma solução de papaína (30 mg.mL<sup>-1</sup>), preparada com o mesmo tampão, e incubado a 60°C, por 24 h. Após incubação, a mistura foi filtrada e

centrifugada (7.965 x g; 25 min; 4°C). Os PS presentes no sobrenadante foram precipitados com a adição de 16 mL de Cloreto de Cetil Piridina (CPC) 10%, por 24 h em temperatura ambiente. O precipitado foi então lavado com 500 mL de CPC 0,05%, dissolvido em 250 mL de NaCl 2M : etanol absoluto (100:15, v/v) e submetido a uma nova precipitação, por 24 horas a 4°C, através da adição de 300 mL de etanol absoluto. Em seguida, a mistura foi centrifugada e o precipitado submetido a duas lavagens com 250 mL de etanol 80% e uma com 150 mL de etanol absoluto. Os PS foram então secos em estufa a 60°C, onde obteve-se o extrato bruto. O extrato algal obtido após a filtração, foi submetido a novas extrações consecutivas com o objetivo de otimizar o rendimento dos PS, totalizando 3 extrações.

### **3.3. Eletroforese em gel de agarose**

O extrato bruto dos PS obtidos em cada uma das três extrações foi analisado por eletroforese em gel de agarose, segundo Dietrich e Dietrich (1976). Para isso, alíquotas contendo aproximadamente 20 µg do extrato bruto de cada extração foram aplicadas em um gel de agarose 0,5% em tampão 1,3-diaminopropano 0,05 M (pH 9,0) e submetidas a uma corrida eletroforética, por 1 h a 120 V. Após a corrida, os PS foram fixados no gel com uma solução de brometo de cetiltrimetilamônio (0,1%), durante 12 h. Após a fixação, o gel foi corado com azul de toluidina a 0,1% e descorado em ácido acético/etanol/água (0,1:5:5, v/v/v).

### **3.4. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados**

Os PS presentes nos extratos brutos das três extrações foram fracionados em coluna de troca iônica DEAE-celulose (6,5 cm x 1,5 cm), equilibrada com o mesmo tampão acetato de sódio utilizado na extração. Em seguida, 10 mg do extrato bruto foram aplicados na coluna, diluídos em 5 mL do tampão de equilíbrio. O fluxo da coluna foi ajustado em 60 mL.h<sup>-1</sup> e os polissacarídeos eluídos, passo a passo, com concentrações crescentes de NaCl (0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4 e 1,6 M) preparadas no mesmo tampão de equilíbrio, sendo coletadas frações de 1 mL. A presença dos PS em cada fração foi verificada através de ensaio metacromático, como descrito por Farndale et al (1986). Para isso, 200 µL de cada fração foram adicionados a 1 mL do corante azul dimetil dimetileno (DMB), o qual reage na presença de sulfato, e a absorbância determinada por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 525 nm. Este método colorimétrico quantifica os teores de sulfato presentes nas amostras, possibilitando a estimativa do conteúdo de PS.

### **3.5. Teste de Dubois**

A presença de açúcar nas amostras foi detectada de acordo com o ensaio colorimétrico proposto por Dubois et al. (1956). O teste foi realizado em duplicata utilizando alíquotas de 50 µL das frações coletadas, as quais foram incubadas por 30 minutos com 350 µL de água destilada, 20 µL de fenol redestilado e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após incubação, a dosagem

de carboidratos totais foi determinada por espectrofotômetro, no comprimento de onda a 490 nm.

### **3.6. Ensaio de sobrevivência e ganho de peso após estresse por hipóxia temporária**

#### 3.6.1. Aquisição e manejo dos juvenis de *Litopenaeus vannamei*

Os exemplares de juvenis de *L. vannamei*, já aclimatados em água doce, foram gentilmente cedidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Federal do Ceará e transportados em sacos plásticos de 30 L com 2/3 de oxigênio e 1/3 de água. Em nosso laboratório, os indivíduos foram acondicionados em uma caixa d'água de 500 L e, em seguida, um total de 128 camarões (1 a 2 g), foram estocados, aleatoriamente, em 16 aquários de vidro (32 L), com água doce e aeração constante, na densidade de oito camarões por aquário.

#### 3.6.2. Delineamento experimental

Os PS obtidos na primeira extração da alga *S. schroederi* foram administrados diariamente, via imersão, em três concentrações distintas e um controle (C = 0,0 mg.L<sup>-1</sup>, T1 = 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, T2 = 1,0 mg.L<sup>-1</sup> e T3 = 2,0 mg.L<sup>-1</sup>), possuindo cada tratamento quatro repetições. A administração das doses foi realizada por 33 dias, sendo o estresse induzido através da supressão temporária da aeração dos cultivos, por cinco horas, no 23°, 24° e 25° dia de



experimento. O arraçoamento dos camarões foi realizado, *ad libitum*, três vezes ao dia, sendo diariamente renovados 20% da água dos aquários para remoção de dejetos e sobras de ração. Dados de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e turbidez foram mensurados duas vezes por semana. A mortalidade foi registrada diariamente e as biometrias realizadas quinzenalmente e no final do experimento, onde todos os camarões foram individualmente pesados e medidos.

### 3.6.3. Monitoramento dos polissacarídeos sulfatados na água dos aquários

A administração diária das doses foi realizada assumindo que, após um período de 24 horas, os PS tenham sido inteiramente absorvidos pelos animais, não havendo um acúmulo do composto na água. Esta suposição foi apoiada por um ensaio prévio, em que os resultados não são mostrados no presente estudo, onde o monitoramento dos PS na água dos aquários foi determinado através de um ensaio metacromático, como descrito por Farndale et al. (1986). Para isto, foram utilizados 2 aquários (30L), com água doce e aeração constante, contendo oito juvenis de camarão em cada um. Um dos aquários foi considerado como controle, enquanto no outro, foram administrados, via imersão,  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  dos PS da alga *S. schroederi*. Em seguida, uma alíquota de 200  $\mu\text{l}$  da água de cada aquário foi coletada e adicionada a 1 mL de DMB, o qual, como já citado anteriormente, reage na presença de sulfato. A absorbância foi então determinada por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 525 nm. Este procedimento foi

repetido a cada hora, por um período de oito horas, sendo uma última leitura realizada 24 horas após a administração dos PS. Vale ressaltar que a água dos aquários foi homogeneizada antes de cada amostragem, buscando evitar uma possível precipitação do composto no fundo, ou cantos dos aquários, sendo a alíquota sempre coletada na região central dos mesmos. Durante o monitoramento foi possível observar um decréscimo contínuo da metacromasia da água do aquário administrado com os PS, chegando à zero 24 horas depois da administração, evidenciando a suposição que os PS são inteiramente absorvidos pelos indivíduos, ao longo do dia. Por outro lado, no controle, como já esperado, não foi detectada metacromasia em nenhuma leitura, devido à ausência dos PS na água do aquário.

### **3.7. Ensaio de sobrevivência após teste de estresse por choque salino**

#### 3.7.1 Aquisição e manejo das pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*

Cerca de 10.500 PL's de *L. vannamei* no estágio de PL<sub>12</sub> foram adquiridas do laboratório de larvicultura de camarão marinho Aquacrusta Marinha Ltda, pertencente à fazenda de camarão Artemiza, localizada no município de Acaraú, Ceará. Os animais foram transportados em sacos plásticos de 30 L, com 2/3 de oxigênio e 1/3 de água na salinidade de 20 ‰. Já em laboratório, após a aclimação, as PL's foram aleatoriamente estocadas em três aquários de vidro (35 L), cada um correspondente a um tratamento, na densidade de 100 PL's.L<sup>-1</sup>, com aeração contínua e salinidade igual a presente

nos sacos de transporte (20‰). O arraçoamento foi realizado quatro vezes ao dia e a renovação de 80% da água dos aquários foi feita diariamente.

### 3.7.2. Delineamento experimental

Os polissacarídeos sulfatados foram administrados diariamente, por seis dias, via imersão, nas concentrações 0,0 mg.L<sup>-1</sup> (T1), 2,0 mg.L<sup>-1</sup> (T2) e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> (T3). As dosagens utilizadas foram estabelecidas a partir do ensaio realizado com juvenis de *L. vannamei*, onde um resultado mais efetivo foi observado após a administração de 2,0 mg.L<sup>-1</sup>, como será descrito no decorrer do trabalho. Já o tratamento 4,0 mg.L<sup>-1</sup> foi escolhido visando observar um aumento, ou não, na resistência das PL's quando administradas com uma maior dosagem. Após o período de administração dos PS, as PL's foram submetidas ao teste de estresse por choque salino, de acordo com o descrito por Tackaert et al. (1989). Para isso, um total de 100 PL's de cada tratamento foi transferido para beckers de vidro distintos, contendo 1 L de água doce (0‰) e aeração suave. Depois de 1 hora, as PL's foram transferidas para novos beckers, com água na salinidade original (20‰) e, após 30 minutos, realizada a contagem das sobreviventes. O experimento foi realizado em tetraplicata para cada tratamento, sendo as PL's descartadas, após o término de cada amostragem. Os indivíduos que não foram submetidos ao teste de estresse foram mantidos nos aquários e, após uma semana, o teste foi repetido, visando verificar uma possível ação prolongada dos PS, uma vez que os mesmos não estavam mais sendo ministrados na água dos aquários.

### **3.8. Análises estatísticas**

As análises dos dados foram realizadas com auxílio do programa STATISTICA, versão 6.0, utilizando a análise de variância com fator único (ANOVA) no nível de significância de 5% e, posteriormente, o teste de Tukey, quando encontrada diferença significativa.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Extração dos polissacarídeos sulfatados

Foram realizadas três extrações consecutivas do extrato da alga parda *S. schroederi*, totalizando um rendimento dos extratos brutos de 38,4%, sendo a maior quantidade de PS encontrada na primeira incubação (29%), decrescendo nas demais (7,83% e 1,55%) (Fig. 4).

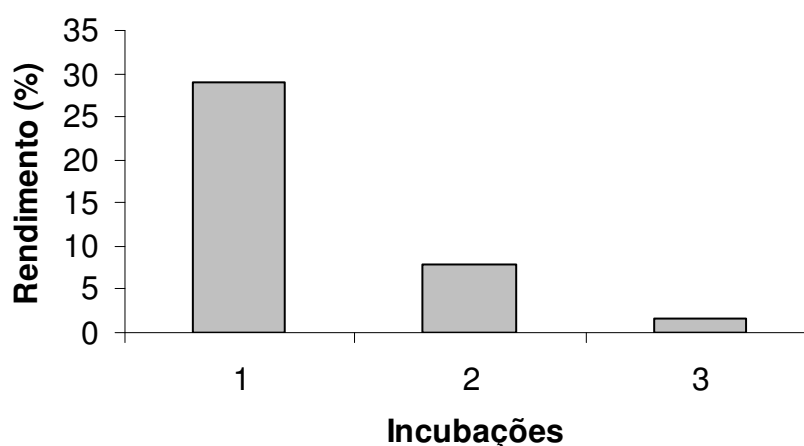


Figura 4: Rendimento (%) dos extratos brutos da alga marinha parda *S. schroederi*, nas diferentes incubações.

Um rendimento total superior foi obtido por Pontes (2005) na extração dos PS da alga vermelha *S. filiformis* (46,8%). No entanto, deve ser levado em consideração que cinco incubações foram realizadas pelo autor. Valores intermediários foram verificados para os extratos brutos da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* (21,4%) (MELO et al., 2002) e das pardas *Sargassum polycystum* (22,3%) (CHOTIGEAT et al., 2004) e *Lobophora variegata* (28,4%) (ALENCAR, 2007). Enquanto rendimentos ainda menores foram encontrados por Rodrigues e Farias (2005) e Bezerra-Neto (2005), para as algas verdes *Caulerpa racemosa* (13%) e *Caulerpa sertularioides* (7,1%).

Torres (2005) avaliou o rendimento dos PS extraídos da alga marinha vermelha *Champia feldmannii*, utilizando duas metodologias distintas. Os métodos de extração em CPC e etanol apresentaram rendimentos totais brutos de 46,6% e 36,2%, respectivamente, para as quatro incubações realizadas. Em ambas as metodologias um maior rendimento foi detectado na segunda incubação.

Assim como no presente estudo, outros trabalhos envolvendo a extração de PS das algas marinhas vermelhas *Solieria filiformis* (PONTES, 2005), *Gracilaria caudata* (ARAÚJO, 2006), *Halymenia sp.* e *Halymenia pseudofloresia* (RODRIGUES, 2006) obtiveram o maior rendimento na primeira extração, decrescendo nas demais incubações. Por outro lado, Pereira et al. (2006) verificaram que os rendimentos obtidos da alga parda do gênero *Sargassum* aumentaram a partir da primeira extração. Já Alencar (2007), em estudo realizado com alga parda *Lobophora variegata*, encontrou maior rendimento na terceira incubação, decrescendo nas demais.

Como é possível observar, existe uma grande variação nos rendimentos de PS extraídos de algas marinhas. Tal fato pode ser atribuído tanto às diferentes metodologias de extração, como à grande heterogeneidade dos PS presentes nas várias espécies de algas.

#### **4.2. Fracionamento em DEAE-celulose**

Os perfis cromatográficos obtidos a partir das três extrações de PS da alga parda *S. schroederi*, em coluna de DEAE-celulose, podem ser observados na Figura 5.

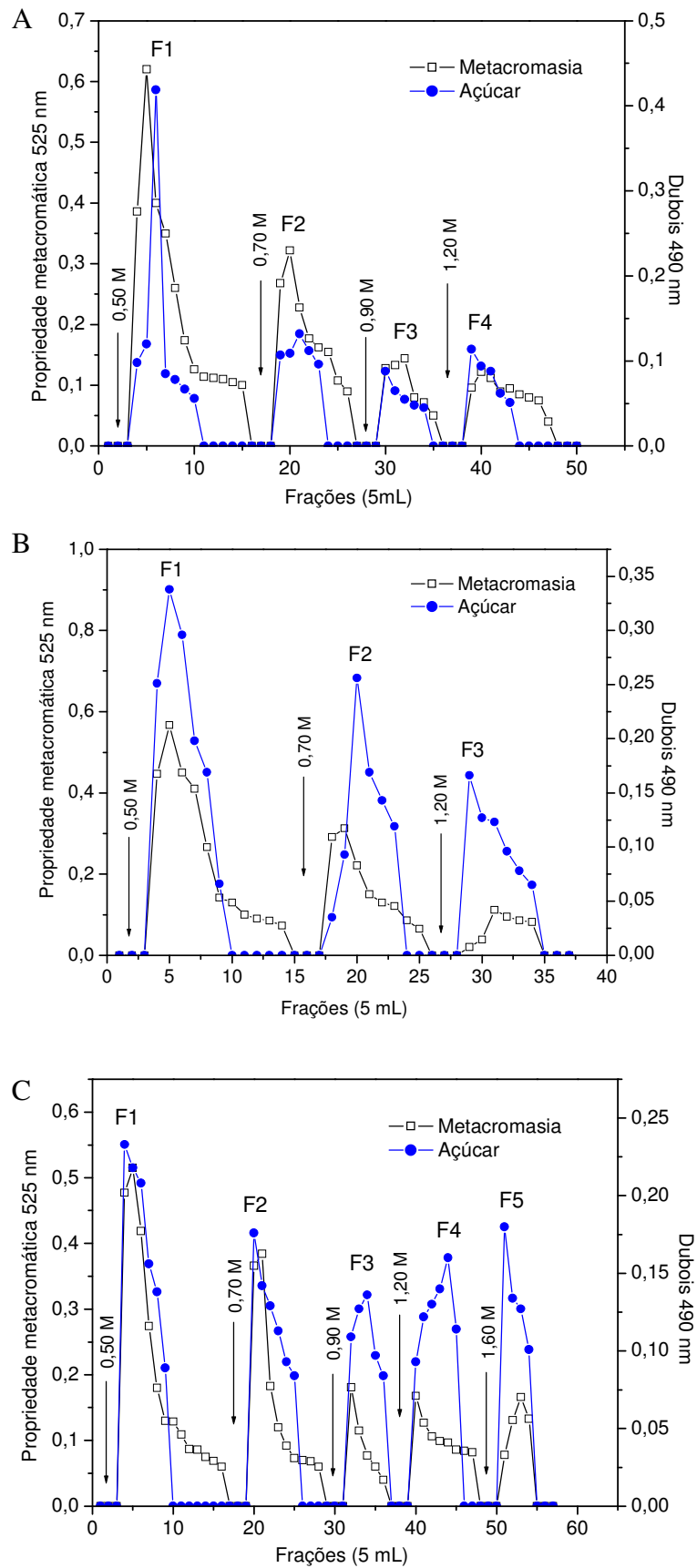


Figura 5: Cromatografia em DEAE-celulose dos PS da alga parda *Spatoglossum schroederi* obtidos, subsequentemente, a partir da 1ª (A), 2ª (B) e 3ª (C) extração. Os teores de sulfato e de açúcar nas frações coletadas foram determinados, respectivamente, por ensaio metacromático (FARNDAL et al. 1986) e pelo teste de Dubois (DUBOIS et al. 1956).

Na primeira extração foram eluídas quatro frações com 0,5; 0,7; 0,9 e 1,2 M de NaCl (Fig. 5A). Na segunda extração, apenas três picos foram eluídos com 0,5; 0,7 e 1,2 M de NaCl, estando ausente a fração 0,9 M (Fig. 5B). Já na terceira, cinco frações foram obtidas, 0,5; 0,7; 0,9; 1,2 e 1,6 M de NaCl, sendo a única a apresentar um pico com 1,6 M (Fig. 5C). Maiores quantidades de sulfato (metacromasia) e de açúcar foram verificadas na fração F1 (0,5 M) nas três extrações realizadas. Entretanto, enquanto a fração F1 da primeira extração foi a mais metacromática, a da segunda apresentou um maior teor de carboidratos.

Rodrigues (2007) também encontrou quatro e três picos, respectivamente, na primeira e segunda extração dos PS da alga vermelha *Halymenia sp.* Entretanto, apenas três frações foram constatadas pelo autor na terceira incubação, sendo a maior atividade metacromática detectada na F2 (0,7 M) da mesma. Já para espécie *H. pseudofloresia*, o autor encontrou cinco, quatro e três picos, respectivamente, sendo a F2 (0,7 M) da segunda incubação a com maior metacromasia.

Alencar (2007) realizou cinco incubações do extrato bruto da alga parda *L. variegata*, verificando seis picos em cada. As frações eluídas com 0,5 e 0,7 M de NaCl foram as mais metacromáticas, sendo a eluída com 0,7 M maior na primeira e segunda extração e a com 0,5 M maior na terceira e quinta. A metacromasia das frações eluídas com 0,5 e 0,7 M de sal foi praticamente igual para a quarta incubação.

Já Torres (2005) observou que o fracionamento dos PS presentes nas quatro incubações, dos dois métodos avaliados, resultaram em frações eluídas nas concentrações de 0,7; 0,9; 1,2 e 1,4 M de NaCl. Entretanto, as



cromatografias apresentaram diferentes perfis metacromáticos, que variaram de acordo com a incubação e o método de extração utilizado.

No presente trabalho foi constatado uma diferença marcante nos perfis metacromáticos obtidos das diferentes extrações do extrato bruto de *S. schroederi*, principalmente ao que se refere à quantidade de frações obtidas e intensidade da atividade metacromática. Resultados semelhantes foram observados no fracionamento dos PS das algas marinhas verdes *C. sertularioides* (BEZERRA-NETO, 2005) e *C. racemosa* (RODRIGUES; FARIAS 2005), e da vermelha *S. filiformes* (PONTES, 2005).

Em estudos anteriores com a mesma alga, os PS foram fracionados por Leite et al. (1998), através de cromatografia de troca iônica, utilizando 0,15; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 M de NaCl. O conteúdo de açúcar diferiu significativamente entre as frações, sendo todas compostas por ácido urônico, fucose e xilose, em diferentes proporções. Assim como no presente trabalho, o pico com maior conteúdo de açúcar total foi observado na fração eluída em 0,5 M de NaCl. Segundo Leite et al. (1998), o ácido urônico, neste caso identificado como ácido algínico, é o principal açúcar presente nos polímeros eluídos em 0,5 e 0,7 M. Por outro lado, as frações eluídas em 1,0 e 1,5 M apresentaram maior quantidade de xilose, enquanto as eluídas em 2,0 e 3,0 M de fucose e sulfato. A xilofucoglucorona sulfatada purificada pelos autores foi eluída em 1 M de NaCl, representando mais de 20% do total de polissacarídeos ácidos presentes no extrato bruto da alga.

Embora no presente não tenha sido realizada a caracterização dos açúcares específicos presentes em de cada fração, considera-se, a partir dos resultados apresentados acima, que as frações eluídas em 0,5 M de NaCl

talvez possam ser compostas, principalmente, por ácido urônico, sendo as demais por xilose, fucose e sulfato.

### 4.3. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese dos polissacarídeos totais presentes nos extratos brutos (Fig. 6) revelou, para as três extrações realizadas, a migração de três bandas metacromáticas, com mobilidade eletroforética distintas, corroborando com Rocha (2002), o qual sugere que a alga parda *S. schroederi* seja composta por três fucanas principais, denominadas de fucanas A, B e C. O mesmo padrão de migração foi observado por Rocha et al. 2005b.

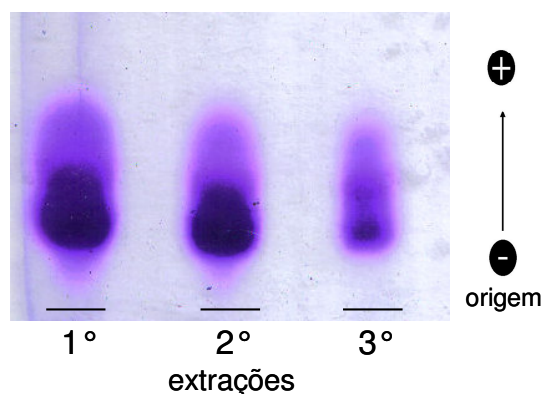


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos sulfatados totais presentes nas três extrações realizadas.

Entretanto, segundo Leite et al. 1998, a combinação dos resultados do fracionamento em coluna de troca iônica e da eletroforese em gel de agarose indicam que a alga *S. schroederi* contém quatro polissacarídeos ácidos principais, com mobilidade distinta, sendo eluídos em diferentes concentrações

de NaCl. Porém, vale ressaltar que o método de extração utilizado pelos autores não foi o mesmo do presente trabalho.

Apesar das três extrações apresentarem, aparentemente, o mesmo conteúdo de PS, a intensidade metacromática das bandas diminuiu ao longo das incubações, resultando em bandas mais definidas (Fig. 6). Este fato sugere que o grau de complexidade dessas moléculas possa estar diminuindo no decorrer das extrações, o que pode ser bastante útil para a caracterização estrutural desses compostos, considerando a complexidade e heterogeneidade dessas moléculas (FARIAS et al. 2002).

Considerando a similaridade do perfil metacromático dos PS presentes em cada uma das extrações, sugere-se que, em estudos futuros, o material extraído nas três incubações seja agrupado, buscando um melhor rendimento dos PS presentes na alga.

#### **4.4. Ensaio de sobrevivência e ganho de peso após estresse por hipóxia temporária**

##### 4.4.1. Parâmetros abióticos da água de cultivo

Durante todo o período experimental, os valores médios de temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram, respectivamente,  $27,5 \pm 0,61$  °C,  $7,63 \pm 0,27$  e  $4,5 \pm 0,73$  mg.L<sup>-1</sup>, permanecendo dentro dos limites recomendados para o cultivo de *L. vannamei* (BARBIERI; OSTRENSKY, 2002).

Os dados de turbidez, que no início estavam próximos de 0, aumentaram gradativamente no decorrer do experimento, chegando a 15

durante o período de supressão parcial da aeração. Os valores mais elevados foram observados nos aquários com grande mortalidade de indivíduos.

#### 4.4.2. Sobrevivência média (%) dos animais ao longo do experimento

A Figura 7 mostra a sobrevivência média diária dos indivíduos de cada tratamento, ao longo do experimento.

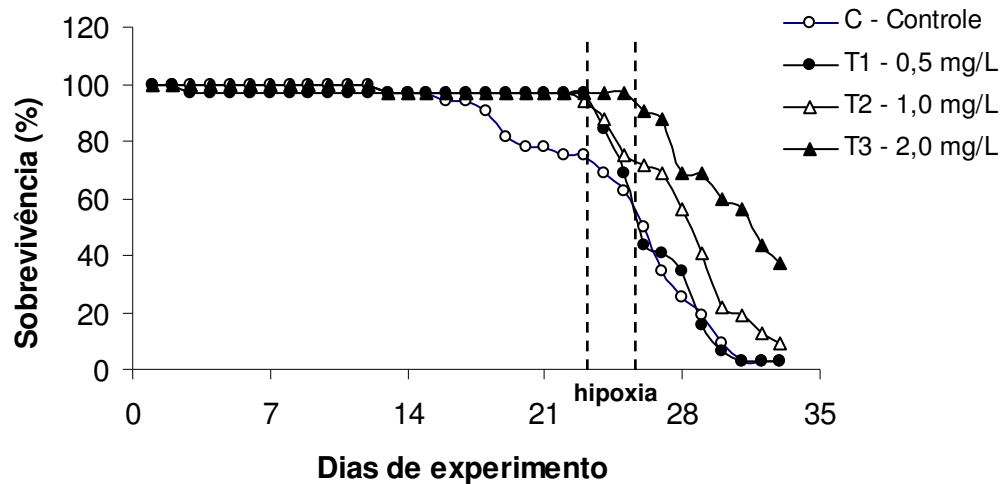


Figura 7: Sobrevivência (%) média ( $\pm$  DP) diária dos juvenis de *L. vannamei*, de cada tratamento, submetidos a estresse por hipoxia, realizado no 23<sup>o</sup>, 24<sup>o</sup> e 25<sup>o</sup> dia de experimento.

Como podemos observar na Figura 8, não foram encontradas diferenças significativas entre os quatro tratamentos analisados, nas quatro primeiras semanas experimentais.

No entanto, após a segunda biometria, 14<sup>o</sup> dia, foi observado o início do declínio na sobrevivência média dos indivíduos do controle (Fig. 7). Esta queda é explicada devido à mortalidade de todos os indivíduos de uma única réplica, explicando, desta forma, o grande desvio padrão observado para o tratamento controle no 21<sup>o</sup> dia (Fig. 8).

Após os episódios de supressão parcial da aeração, realizados no 23°, 24° e 25° dia, foi observado um declínio na sobrevivência de todos os tratamentos analisados (Fig. 7). Entretanto, na quarta semana, apesar de não detectada diferença estatística entre os tratamentos, os valores médios de sobrevivência podem ser considerados marginalmente significativos ( $p=0,1488$ ), sendo possível observar uma tendência crescente da sobrevivência média em relação ao aumento das dosagens testadas, no 28° dia (Fig. 8). Maiores quedas foram registradas na sobrevivência do controle (25%) e T1 (34,37%), valores intermediários no T2 (56,25%) e um menor declínio no T3 (68,75%).

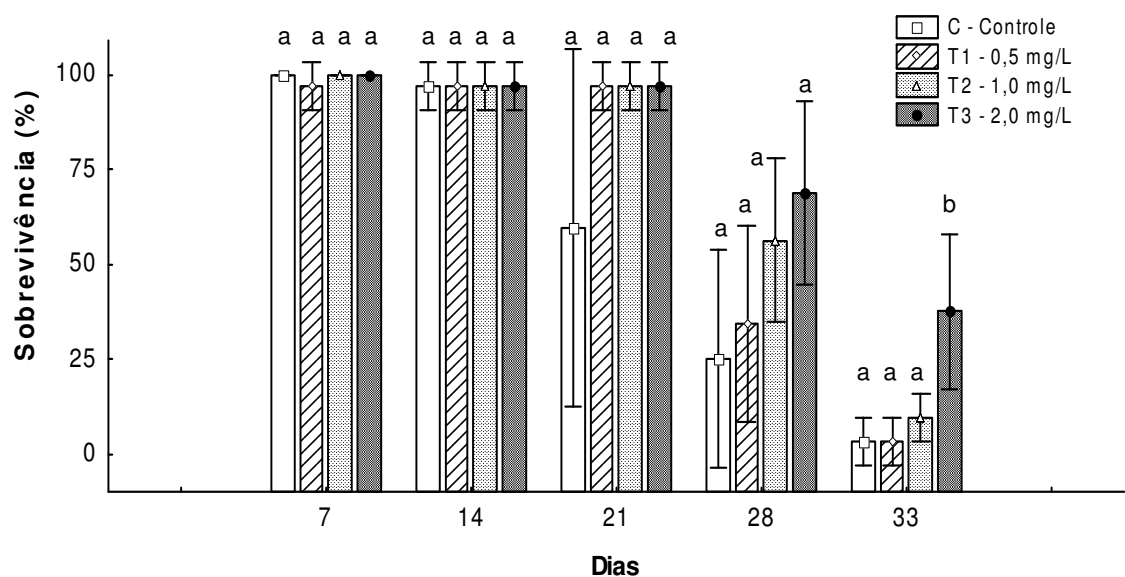


Figura 8: Sobrevivência (%) média ( $\pm$ DP) semanal dos juvenis de *L. vannamei*, de cada tratamento, submetidos a estresse por hipóxia, realizado no 23°, 24° e 25° dia de experimento. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre os tratamentos.

Após a quarta semana, a sobrevivência dos animais em todos os tratamentos declinou ainda mais (Fig. 8), provavelmente devido à intensificação do estresse causado pela terceira biometria, realizada no 28° dia. Depois deste período, foi observado, além das altas taxas de mortalidade, falta de apetite,

comportamento letárgico e aparecimento de regiões melanizadas na carapaça dos camarões. Além disso, a qualidade da água dos aquários foi visivelmente alterada, apresentando coloração turva e mau cheiro. Entretanto, foi observado que os camarões do T3 apresentaram atividade aparentemente maior, com indivíduos portando pouca, ou nenhuma, melanização na carapaça.

No final do experimento, 33º dia, foi detectada uma diferença significativa na sobrevivência dos quatro tratamentos ( $F=5,968$ ;  $p=0,0114$ ) (Fig. 8). O teste de Tukey indicou que a sobrevivência média dos camarões submetidos à dose de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  (37,5%) foi significativamente superior que as verificadas para o controle (3,12%),  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (3,12%) e  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  (9,37%). Novamente, foi possível observar uma tendência crescente na sobrevivência média dos indivíduos, em relação ao aumento da dosagem administrada.

Vale ainda ressaltar que os camarões foram cultivados em água doce, representando um fator adicional de estresse aos indivíduos. Este fato se deve ao camarão *L. vannamei*, durante a fase juvenil, apresentar o seu ponto isosmótico em águas com salinidade entre 18 e 22 ‰, não gastando energia no processo de osmoregulação. Dessa forma, quando criados em água doce necessitam de um maior gasto energético para a regulação osmótica adequada, o que resulta na debilitação dos animais, facilitando a contaminação por patógenos causadores de doenças (BARBIERI; OSTRENSKY, 2001).

As altas taxas de mortalidade, o comportamento moribundo e o aparecimento de lesões melanizadas, após o período de estresse, podem ser considerados sinais característicos de infecções bacterianas em geral, especialmente as vibrioses.

Segundo Aguirre-Guzmán et al. (2001), as vibrioses são classificadas como infecções secundárias e oportunistas, atacando todos os estágios de vida do camarão. Problemas com vibriose ocorrem quando há condições de estresse no sistema de cultivo, tais como: diminuição de oxigênio, densidade de estocagem excessiva, manuseio inapropriado do estoque, lesões na cutícula dos camarões, subalimentação, e altas concentrações de compostos nitrogenados no ambiente de cultivo.

O processo de infecção da vibriose pode ser cuticular, entérico (intestinal) e sistêmico (envolvendo vários órgãos). Quando localizada, apresenta lesões melanizadas na carapaça e/ou abscessos pontuais no hepatopâncreas. O impacto da vibriose é variável, podendo, em alguns casos, pode alcançar até 70% da população cultivada. Na vibriose crônica, camarões mortos ou moribundos podem ser canibalizados rapidamente, contaminando outros indivíduos da população (SAULNIER et al., 2000). Este comportamento foi observado durante o experimento, podendo ser a causa da grande e acentuada mortalidade verificada.

Rodrigues (2006) também encontrou um aumento significativo na sobrevivência de camarões *L. vannamei* submetidos à imersão ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), com os PS da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia*, durante o período de supressão da renovação da água dos cultivos.

De acordo com Le Moullac et al. (1998), camarões *Litopenaeus stylirostris* expostos por 24 horas a condições severas de hipoxia,  $1 \text{ mg.O}_2\text{mL}^{-1}$ , apresentaram maior mortalidade (48%), quando contaminados com o *V. alginolyticus*, em relação ao controle (32%).

Chotigeat et al. (2004) relataram um aumento da sobrevivência de camarão *P. monodon*, infectados pelo vírus causador da mancha branca, após a administração oral do fucoidam extraído da alga parda *S. polycystium*. O controle da infecção pelo WSSV já havia sido reportado para o camarão *Marsupenaeus japonicus*, submetidos a dietas contendo outro fucoidan, da alga parda *Cladosiphon okamuranus* (TAKAHASHI et al., 1998).

Maiores sobrevivências também foram observadas por Huang et al. (2006) em camarões *F. chinensis*, infectados pelo *V. harveyi*, quando alimentados com dietas suplementadas com PS extraído da alga parda *S. fusiforme*.

Cheng et al. (2004 e 2005) avaliaram a eficiência da administração de alginato de sódio, sal do ácido algínico extraído de algas pardas, via injeção e suplementado na dieta, respectivamente, em camarões *L. vannamei* contaminados pelo *V. alginolyticus*. Os autores verificaram que a sobrevivência dos camarões de todos os tratamentos contendo alginato de sódio foram significativamente superiores às do controle.

Yeh et al. (2006) e Fu et al. (2007) analisaram a eficiência de diferentes métodos de administração do extrato quente da alga parda *Sargassum duplicatum* e da vermelha *Gelidium amansii*, respectivamente, em camarões *L. vannamei* infectados por *V. alginolyticus*. Em ambos os trabalhos, a sobrevivência e os parâmetros imunológicos avaliados, de todos os métodos de administração, foram significativamente maiores em relação ao controle, comprovando a habilidade dos compostos de elevar a imunidade e a resistência contra infecção do *V. alginolyticus*.



Como é possível observar, diversos trabalhos vêm relatando a eficiência da administração dos PS de algas marinhas pardas, no aumento da resistência de camarões em situações de estresse ou de contaminação por patógenos. No presente trabalho, a administração dos PS da alga marinha parda *S. schroederi*, em juvenis de *L. vannamei*, via imersão, na concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup>, resultou em um aumento significativo da sobrevivência dos camarões submetidos a condição de estresse por hipoxia, sugerindo um possível efeito imunestimulante deste composto, o qual merece ser investigado em estudos posteriores.

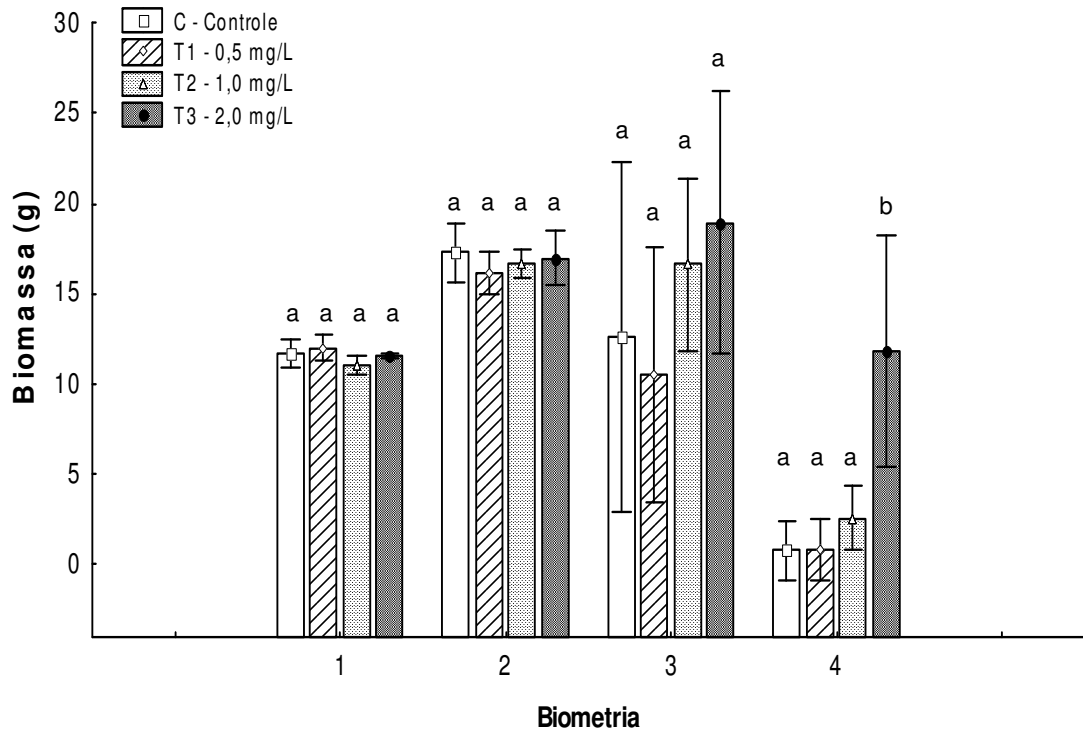
#### 4.4.4. Biomassa média (g)

A Figura 9 mostra a variação quinzenal da biomassa média dos indivíduos de cada tratamento, ao longo do experimento.

Não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos, nas três primeiras biometrias realizadas (Fig. 9). Entretanto, a partir da segunda, foi observado um declínio na biomassa média do controle e do T1. Esta tendência se intensificou após o início da indução do estresse, no 23º dia de experimento. Este fato pode ser explicado pela maior mortalidade dos indivíduos registrada para estes tratamentos. Já o aumento da biomassa média verificado para o T2 e T3, no mesmo período, pode ser atribuído ao crescimento dos camarões e às menores taxas de mortalidade verificadas.

Após a terceira biometria, foi constatada uma redução na biomassa média de todos os tratamentos, devido o aumento da mortalidade decorrente do estresse causado pelos períodos de supressão parcial da aeração, o qual

foi intensificado pelo manejo dos camarões durante a biometria, realizada no 28º dia.



Figurante 9: Biomassa (g) média quinzenal ( $\pm$ DP) dos juvenis de *L. vannamei*, de cada tratamento. Letras diferentes sobre as barras indicam presença de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos.

No final do experimento, um valor médio significativamente maior ( $F=8,919$ ;  $p=0,0022$ ) foi encontrado para o T3 (11,85 g), quando comparado aos valores dos tratamentos controle (0,81 g), T1 (0,86 g) e T2 (2,58 g) (Fig. 9). Este comportamento das médias foi similar ao encontrado para os valores de sobrevivência final, indicando uma já esperada relação entre estes parâmetros.

#### 4.4.5. Crescimento médio em peso (g) e comprimento (mm)

As tendências de crescimento médio, no período experimental, foram de acordo com as esperadas para a espécie, não sendo detectadas diferenças significativas entre os tratamentos, nas quatro biometrias realizadas, tanto para peso, como para comprimento (Fig. 10 e 11).

Apesar da ausência de diferença significativa entre as médias de peso e comprimento entre os tratamentos, os camarões submetidos à dose de 2 mg.L<sup>-1</sup> apresentaram a maior atividade e consumo alimentar, em comparação aos outros tratamentos, mesmo durante o período de estresse, e uma maior uniformidade entre os indivíduos, no final do experimento (Fig. 10 e 11).

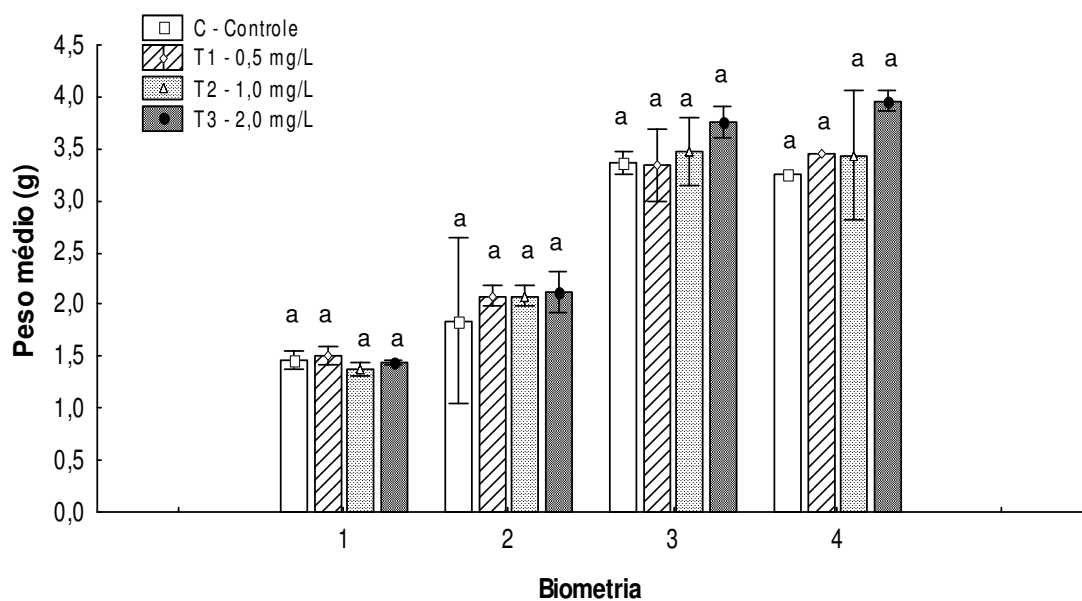


Figura 10: Peso (g) médio ( $\pm$ DP) quinzenal dos juvenis de *L. vannamei*, de cada tratamento. Letras iguais sobre as barras indicam ausência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos.

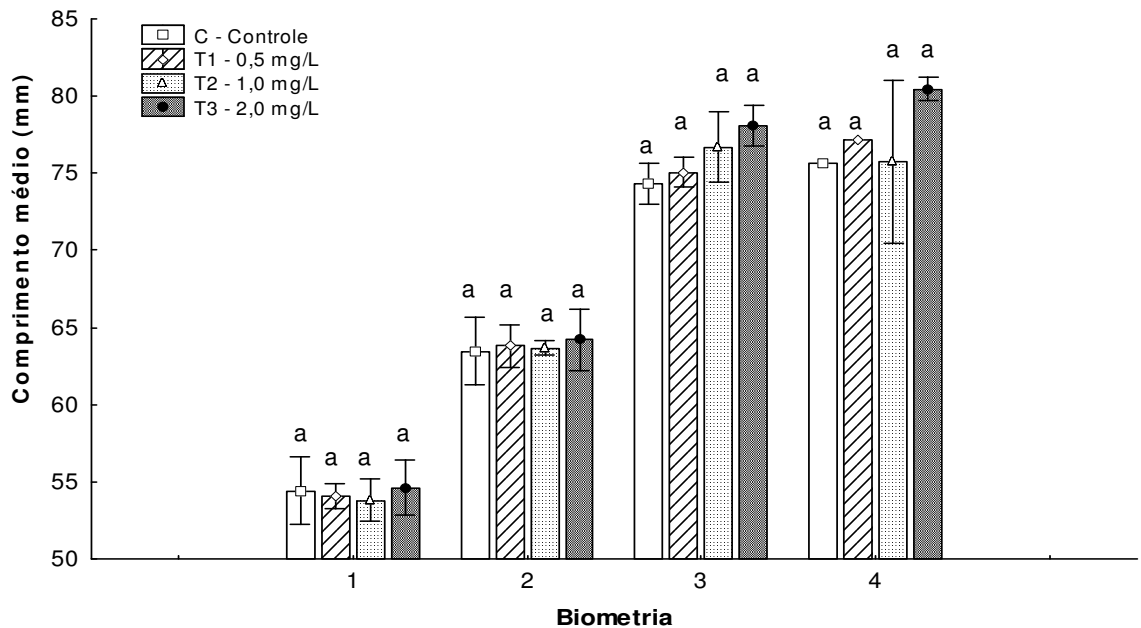


Figura 11: Comprimento (mm) médio ( $\pm$ DP) quinzenal dos juvenis de *L. vannamei*, de cada tratamento. Letras iguais sobre as barras indicam ausência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos.

Rodrigues (2006) e Barroso et al. (2007) também não encontraram diferença significativa em relação ao ganho de peso em juvenis e pós-larvas de *L. vannamei*, tratados com PS, via imersão, extraídos das algas marinhas vermelhas *H. pseudofloresia* e *B. occidentalis*, respectivamente.

Em outro estudo, dietas suplementadas com PS da alga marinha parda *S. fusiforme*, nas concentrações 0%, 0,5%, 1,0% e 2,0%, foram ofertadas por 14 dias a camarões *F. chinensis* contaminados pelo *V. harveyi*. Não foi encontrada diferença significativa em relação ao ganho de peso final entre os indivíduos dos tratamentos testados (HUANG et al., 2006).

Por outro lado, Montero-Rocha et al. (2006) encontraram pesos e comprimentos significativamente maiores em *L. vannamei* alimentados, por 15 dias, com ração suplementada com 0,5% de Ergosan, produto algal contendo 1% de ácido algínico. Um efeito similar foi constatado por Cruz-Suárez et al. (2000) e Riviera et al. (2002) quando incluído 2 e 4% e 10%, respectivamente,

de farinha da alga marinha parda *Macrocystis pyrifera* em alimento peletizado para camarões. Um maior crescimento também foi verificado por Sung et al. (1994) em camarões *P. monodon* alimentados com  $\beta$ -1,3/1,6-glucana.

Boonyaratpalin et al. (1993) reportaram que o camarão *P. monodon* alimentado com ração suplementada com 0,01% de peptidoglicana apresentaram melhor crescimento e taxa de conversão alimentar, que àqueles alimentados com a dieta controle. O mesmo efeito não foi observado com a suplementação de 0,1% do composto.

Apesar da obtenção de indivíduos mais resistentes às enfermidades ser o principal propósito da imunoestimulação na carcinicultura, um maior incremento no crescimento e/ou conversão alimentar podem ser considerados efeitos adicionais relevantes para a atividade. De acordo com os trabalhos citados acima, crescimentos significativamente maiores foram verificados quando os compostos foram incorporados à dieta, corroborando com o proposto por Bricknell e Dalmo (2005) e Van de Braak (2002), os quais descrevem este método como o mais eficiente na absorção dos imunoestimulantes. Desta forma, sugere-se que um possível resultado positivo, em relação ao crescimento, possa ser obtido através da incorporação do extrato bruto ou dos PS da alga marinha parda *S. schroederi*, na ração de camarão *L. vannamei*.

## 4.5. Ensaio de sobrevivência após teste de estresse por choque salino

### 4.5.1. Sobrevivência média (%)

Os PS da alga parda *S. schroederi* foram administrados por seis dias, via imersão, em duas concentrações distintas e uma controle ( $0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $4 \text{ mg.L}^{-1}$ ), às PL's de camarão *L. vannamei*. Após este período, foi realizado o teste de estresse por choque salino, com quatro repetições consecutivas para cada tratamento.

Em decorrência do suposto encerramento do experimento, as PL's que não foram submetidas ao estresse salino permaneceram durante quatro dias sem alimentação e renovação da água. Após este período, foi observada a mortalidade total dos exemplares do aquário controle, enquanto os animais tratados com PS apresentaram grande sobrevivência. A partir deste episódio e de uma possível correlação com a administração dos PS, surgiu a idéia de repetir o ensaio com as sobreviventes, após uma semana, buscando verificar o tempo de ação e um possível efeito prolongado do composto, que não foi mais administrado. A partir de então, os cuidados padrões com a alimentação e renovação de água foram retomados.

Os tratamentos foram chamados de C, T1, T2 e de C', T1', T2', respectivamente, para o primeiro e o segundo período amostral.

A Análise de Variância Univariada (ANOVA) detectou diferença significativa ( $F=63,71$ ;  $p < 0,01$ ) na sobrevivência média entre os tratamentos da primeira amostragem e, também, destes em relação aos da segunda amostragem (Fig. 12).

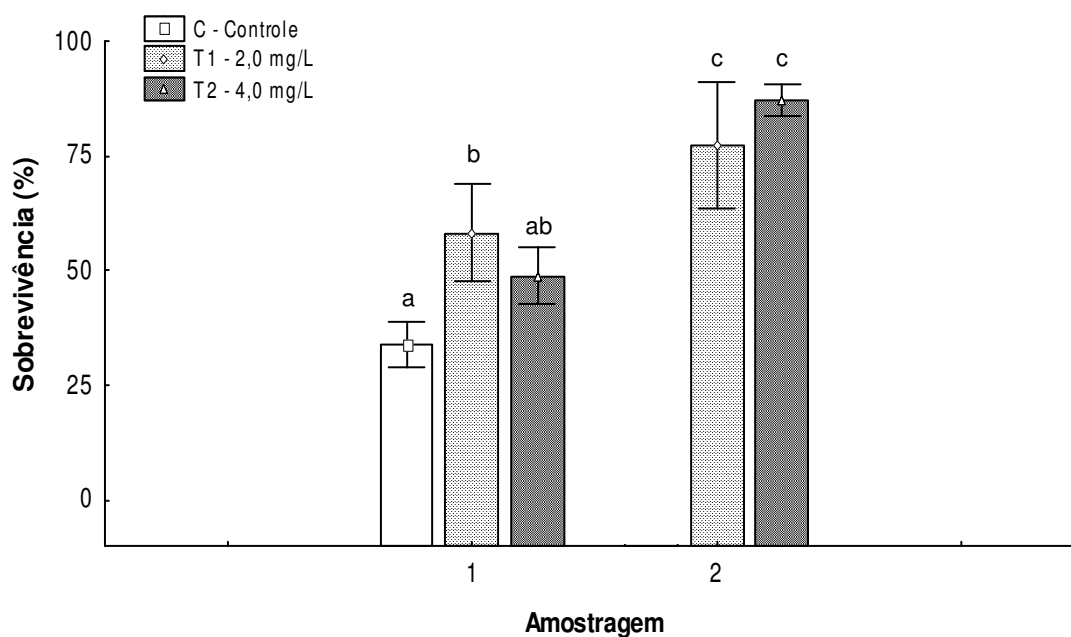


Fig 12: Sobrevivência (%) média ( $\pm$ DP) das PL's de *L. vannamei*, de cada tratamento, submetidas a estresse por choque salino, na primeira e segunda amostragem. A primeira amostragem foi realizada após seis dias ininterruptos de administração dos PS. Enquanto a segunda, uma semana depois de encerrado o período de administração do composto. O tratamento controle da segunda amostragem (C') não é observado no gráfico, pois neste foi registrado a mortalidade total dos indivíduos. Letras diferentes sobre as barras de indicam presenças de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos.

Na primeira, de acordo com o Teste de Tukey, a sobrevivência média dos indivíduos administrados com a dose intermediária de 2 mg/L (58,25%) foi significativamente superior ( $p=0,004$ ) a do controle (34%), não apresentando diferença significativa em relação à maior dosagem testada (48,75%). Embora a sobrevivência média do T2 tenha sido superior ao controle, não foi detectada diferença significativa entre os dois tratamentos (Fig. 12).

Já na segunda amostragem, não foi encontrada diferença significativa na sobrevivência média dos tratamentos T1' (77,25%) e T2' (87,25%), uma semana após a aplicação dos PS (Fig. 12). Entretanto, um aumento significativo foi observado na sobrevivência tanto do T1' ( $p=0,031$ ), como do T2' ( $p=0,0001$ ), em relação ao primeiro período amostral, sugerindo um possível

efeito prolongado para o composto (Fig. 12). Este aumento foi ligeiramente superior para o tratamento T2', podendo estar relacionado ao fato de dosagens mais elevadas possuírem um maior período residual, permanecendo no organismo dos camarões por mais tempo.

Barroso et al. (2007) avaliaram a sobrevivência de PL's de *L. vannamei* submetidas a imersão, nas concentrações 0,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , 1,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 1,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , em soluções contendo PS das algas vermelhas *B. occidentalis*. O autor também verificou uma sobrevivência significativamente superior no tratamento referente à dose intermediária de 1,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Por outro lado, Sung et al. (1994) verificaram que camarões *P. monodon* submetidos a imersões com a maior dose de  $\beta$ -1,3 glicana testada (2,0  $\text{g.L}^{-1}$ ), apresentaram menor resistência à vibrioses, sugerindo um efeito imunossupressor ao dosagem. Resultados similares foram reportados por Boonyaratplain et al. (1993) e Huang et al. (2006) onde a administração oral de dosagens elevadas de peptidoglicana (0,1%) e do extrato de PS da alga parda *S. fusiforme* (2,0%), respectivamente, causaram a inibição das respostas imunes em camarões *P. monodon* e *F. chinensis*.

Em relação ao período de administração, resultado semelhante foi obtido por Itami et al. (1998), os quais intercalaram períodos de sete dias administrando dieta contendo 0,2% de peptidoglicana, com outros sete, ofertando ração comum. Após 65 dias de experimento, os autores reportaram um aumento significativo na resistência de camarões *M. japonicus*, à infecção por *V. penaeicida*.

Sung et al. (1994) e Dugger (1999) relatam que a administração de dietas contendo  $\beta$ -1,3 glicana, duas vezes por semana, é suficiente para



manter uma ativação celular ótima do sistema imune de crustáceos. Por outro lado, segundo Campa-Córdoba et al. (2002), apenas uma exposição de 6 horas em  $\beta$ -1,3 glicana ou de 3 horas em laminarina, extraída da alga parda *Laminaria digitata*, foram suficientes para ativar respostas imunológicas em camarões *L. vannamei*.

Sung et al. (1996) observaram que o aparente efeito benéfico das imersões com  $\beta$ -glicana ou em vibrio bacteriano durou no máximo 24 horas, retornando, após este período, a níveis similares ao do controle. Por outro lado, Raa (2000), revisando trabalhos de diversos autores, discute que o aumento da resistência contra o *V. vulnificus* pode durar de 2 a 3 semanas após uma única administração de  $\beta$ -1,3/1,6 glucana, em PL's de camarão.

Como é possível observar, existe uma grande discrepância em relação aos resultados referentes à dosagem ideal e ao tempo de administração e de ação dos compostos, sendo estes fatores fundamentais para a obtenção de resultados satisfatórios na imunoestimulação de crustáceos.

No presente ensaio, apenas seis dias de administração, via imersão, dos PS foram suficientes para uma aparente imunoestimulação das PL's de camarão *L. vannamei*, com este efeito se prolongando por uma semana. Os resultados indicam, ainda, a ausência de uma dose-dependência, não sendo evidenciado uma correlação entre o aumento da sobrevivência e o aumento da dosagem ( $4 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Assim como no ensaio com juvenis, o tratamento referente à dosagem de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  apresentou resultados mais efetivos em relação à sobrevivência média dos indivíduos, podendo indicar uma suposta presença de propriedades imunoestimulantes neste composto. No entanto, apesar do efeito positivo

constatado, estes resultados devem ser considerados preliminares. Sendo assim, deve-se dar continuidade ao estudo, buscando otimizar o tempo e método de administração, a dose ideal a ser empregada e os mecanismos de ação dos PS. É de fundamental importância ainda, se comprovar a eficiência imunoestimulante do composto através da avaliação de parâmetros hematoimunológicos comumente empregados em crustáceos, como: contagem total de hemócitos, índice fagocítico, tempo de coagulação da hemolinfa, atividade da enzima PO, produção de espécie ativas de oxigênio, entre outros.

## 5. CONCLUSÕES

1. Podem ser realizadas três incubações do extrato bruto da alga marinha parda *S. schroederi*, com um rendimento total de 38,4%, sendo o mais efetivo o da primeira incubação (29%).
2. O fracionamento em coluna de troca iônica mostrou uma grande diferença no perfil metacromático entre os PS extraídos nas distintas incubações, com maior metacromasia e quantidade de açúcar verificada na fração F1 (0,5 M), das três extrações realizadas.
3. De acordo com a eletroforese em gel de agarose, o conteúdo dos PS presentes no extrato das três incubações é, aparentemente, o mesmo, apresentando três bandas metacromáticas de migração eletroforética distintas.
4. A administração via imersão dos PS da alga parda *S. schroederi* não influenciou significativamente no crescimento médio, em peso (g) e comprimento (mm), dos juvenis de camarão *L. vannamei*. Já a sobrevivência média foi estatisticamente superior para os indivíduos administrados com a dose 2 mg.L<sup>-1</sup>.
5. O aparente efeito protetor dos PS não se mostrou dose-dependente, não sendo observado um aumento significativo na sobrevivência média de PL's de *L. vannamei*, com o aumento da dosagem empregada (4mg.L<sup>-1</sup>).

A sobrevivência dos indivíduos administrados com as doses  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $4 \text{ mg.L}^{-1}$  aumentou significativamente, após um intervalo de uma semana, indicando um possível efeito prolongado do composto.

6. A partir dos resultados obtidos em ambos os ensaios, conclui-se que a administração, via imersão, da dose  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  foi a mais efetiva, promovendo uma maior resistência aos indivíduos quando submetidos a condições de estresse, sugerindo um possível efeito imunoestimulante ao composto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LITCHMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. São Paulo: Elsevier Brasil, 2005. 596p.

AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VÁSQUEZ-JUÁREZ, R. and ASCENCIO, F. Differences in the susceptibility of american white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 215-219, 2001.

ALENCAR, D.B. **Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata***. Fortaleza, 2007. 30f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

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.

ANDERSSON, L.O.; BARROWCLIFFE, T.W.; HOLMER, E.; JOHNSON, E.A.; SIMS, G.E.C. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel filtration. **Thrombosis Research**, v. 9, n.6, p. 575-580, 1976.

ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. Selection in microbial ecology. **Adv. Microb. Ecol.**, v.9, p.99-147, 1986.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n.10, p.1993-2000, 2003.

AQUINO, R.S.; LANDEIRA-FERNADEZ, A.M.; VALENTE, A.P.; ANDRADE, L.R.; MOURÃO, P.A.S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, v.15, n.1, p.11-22, 2005.

ARAÚJO, 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.

ARAÚJO, P.M.; OLIVEIRA, G.B.; CÓRDULA, C.R.; LEITE, E.L.; CARVALHO, L.B.; SILVA, M.P.C. Sulfated fucan as support for antibiotic immobilization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.301-305, 2004.

BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, v.191, p.3-11, 2000.

BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; de LORGERIL, J.; GARNIER, J.; ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v.198, p.149-170, 2004.

BARBIERI, R.C.J.; OSTRENSKY, A.N. **Camarões marinhos – Reprodução, Maturação e Larvicultura**. 1. ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2001. 255p.

BARBIERI, R.C.J. e OSTRENSKY, A.N. **Camarões marinhos – Engorda**. 1. ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 352p.

BARRACCO, M.A.; PERAZOLLO, L.M.; ROSA, R.D. **Imunologia de crustáceos com ênfase em camarões**. 80p. Disponível em: < <http://www.liaaq.ufsc.br/>>. Acesso em: 15 de dez. 2007.

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 Agrônômica**, v.38, n.1, p.58-63, 2007.

BARTLETT, T.C.; CUTHBERTSON, B.J.; SHEPARD, E.F.; CHAPMAN, R.W.; GROSS, P.S.; WARR, G.W. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Marine Biotechnology**, v.4, p.278-293, 2002.

BAYNE, J.C. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. **BioScience**, v.40, n.10, p.723-731, 1990.

BERGER, C. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. In: AVANCES EM NUTRICIÓN ACUÍCOLA. MEMORIAL DEL V SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Yucatan. **Anais eletrônicos...** Yucatan:Merida, 2000. p.102-110. Disponível em: <[www.educacion.uanl.mx/publicaciones/maricultura/acuiculturaV/berger.pdf](http://www.educacion.uanl.mx/publicaciones/maricultura/acuiculturaV/berger.pdf)>. Acesso em: 11 de jul. 2007.

BEZERRA-NETO, J.T.B. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides***, 29f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

BJORKLUND, H.; BONDESTAM, J.; BYLUND, G. Residues of OTC in wild fish and sediment from fish farms. **Aquaculture**, v. 86, p.359-367, 1990.

BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F.; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C.; FISCHER, A.M.; DE AGOSTINE, A.; JOZEFONVICZ, J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs of the Future**, v.20, n.12, p.1237-1249, 1995.

BOONYARATPALIN, S.M.; BOONYARATPALIN, K.; SUPAMATTAYA, K.; BOONYARATPALIN, M. Effects of peptidoglycan on growth, survival, immune response and tolerance to stressor in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). In: DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE II. PROCEEDING OF THE SECOND SYMPOSIUM ON DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE, 2., 1993, Phuket. **Anais...** Phuket:ABCM, 1993. p.469–477.

BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A. BORGHETTI, J.R. **Aquicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 128p. 2003.

BRICKNELL, I.; DALMO, R. A. The use of immunoestimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v.15, n.5, p. 457-472, 2005.

CADEIA PRODUTIVA DO CAMARÃO MARINHO. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1999. Disponível em: <[http://www.acaq.org.br/arquivos/cadeia\\_camarao\\_marinho.PDF](http://www.acaq.org.br/arquivos/cadeia_camarao_marinho.PDF)>. Acesso em: 25 de jun. 2007.

CAMPA-CÓRDOBA, A.I.; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N.Y.; PHILIPPIS, R.; ASCENIO, F. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulfated polysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, v.12, n.4, p.353-366, 2002.

CARVALHO, R. **Camarões marinhos, gestão de qualidade e rastreabilidade na fazenda**. Recife: ABCC, Associação Brasileira de Criadores de Camarão, 2005. 95p. Disponível em: <[www.abccam.com.br/download/Get%E3odeQualidade-Grande.pdf](http://www.abccam.com.br/download/Get%E3odeQualidade-Grande.pdf)>. Acesso em: 15 de jun. 2007.

CENAIM INFORMA. **WSSV y temperatura, immunoestimulantes, vitaminas... Como se relaciona todo?** Boletín Informativo Quincenal, 2001. 1p. Disponível em: <[www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/quincenal/bquinc44.pdf](http://www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/quincenal/bquinc44.pdf)> Acesso em: 03 de nov. 2007.

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

CHANG, C.F.; SU, M.S.; CHEN, H.Y.; LIAO, I.C. Dietary-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. **Fish & Shellfish Immunology**, v.15, p.297-310, 2003

CHATTOPADHYAY, K.; MATEU, C.G.; MANDAL, P.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; DAMONTE R. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. **Phytochemistry**, v.68, n.10, p.1428-1435, 2007.

CHENG, W.; LIU, CH.; YEH, S.T.; CHEN, J.C. The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance

against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.17, p.41-51, 2004.

CHENG, W.; LIU, C.H.; KUO, C.M.; CHEN, J.C. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.18, p.1-12, 2005

CHO, S.H.; KANG, S.E.; CHO, J.Y.; KIM, A.R.; PARK, S.M.; HONG Y.K.; AHN, D.H. The Antioxidant Properties of Brown Seaweed (*Sargassum siliquastrum*) **Extracts. Journal of Medical Food**, v.10, n.3, p.479-85, 2007.

CHOTIGEAT, W.; TONGSUPA, S.; SUPAMATAYA, K; PHONGDARA, A. Effect of fucoïdan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, v.233, n.1-4, p.23-30, 2004.

COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, J.D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, v.14, n.4, p.333-345, 2003.

CÓRDOBA, A.I.C.; SAAVEDRA, N.Y.H.; GUZMÁN, G.A.; ASCENCIO, F. Respuesta inmunomoduladora de la superóxido dismutase em juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuestos a inµmunoestimulantes. **Ciências Marinas**, v.31, n.4, p.661-669, 2005.

COSTA, F.H.F., FARIAS, W.R.L.; SAMPAIO, A.H.; SAKER-SAMPAIO, S.; ROCHA, I.R.C.B.; PONTES, G.S.; SILVA, C.M.; SILA-NETO, J.F.; DA SILVA, F.L.S.; NUNES, E.V.; DE SOUZA, A.L.F.; LIMA-JÚNIOR, T.B. Enhancement of disease resistance against infectious mycronecrosis vírus (IMNV) of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* by sulfated polysaccharides extracts from the red seaweeds *Botryocladia occidentalis* and *Solieria filiformis*. In: III SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE INDÚSTRIA DO CAMARÃO CULTIVADO, 3., 2006, Natal. **Anais...** Natal: ABCN, 2006. p.69-77.

CRUZ-SUÁREZ, E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M; GUAJARDO-BARBOSA, C. Uso de harina de Kelp (*Macrocystis pyrifera*) em alimentos para camarón. In: AVANCES EM NUTRICIÓN ACUÍCOLA V. MEMÓRIAS DEL V SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA. 5., 2000, Yucatan. **Anais eletrônico...** Yucatan: Merida, 2000. p. 227-266. Disponível em: <[www.educacion.uanl.mx/publicaciones/maricultura/acuiculturaV/cruz-suarez.pdf](http://www.educacion.uanl.mx/publicaciones/maricultura/acuiculturaV/cruz-suarez.pdf)>. Acesso em: 17 de set. 2007.

DAR, A.; BAIG, H.S.; SAIFULLAH, S.M.; AHMAD, V.U.; YASMEEN, S.; NIZAMUDDIN, M. Effect of seasonal variation on the anti-inflammatory activity of *Sargassum wightii* growing on the N. Arabian Sea coast of Pakistan. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.351, n.1-2, p.1-9, 2007



DIAS, P.F.; SIQUEIRA, J.M.; VENDRUSCOLO; L.F.; JESUS, N.T.; GAGLIARDI, A.R.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO, V.R.M. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.56, n.4, p.436-446, 2005

DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochemistry**, v.70, n.2, p.645-647, 1976.

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.

DIXON, B.A. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. **Fish and Crustacean Larviculture Symp**, v.15, p.419, 1991.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p.350-354, 1956.

DUGGER, D. Bio-modulation of the non-specific immune response in marine shrimp with beta-glucan. **Aquaculture Magazine**, v.25, p.81-86, 1999.

ERTESVIG, H.; VALLA, S. Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p.85-91, 1998.

FARIAS, W.R.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**. v.275, n.38, p. 29299-307, 2000

FARNDAL, R.W., BUTTLE, D. J., BARRET, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethyl-methylene blue. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.883, p.173-177, 1986.

FEGAN, D. F.; CLIFFORD, H.C. Health Management for Viral Diseases in Shrimp Farms. In: BROWDY, C. L.; DARYL, E. J. **The New Wave, Proceedings of The Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture**. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States. 2001. p.168-198.

FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. Viral Pathogenesis. In: **Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis and control**. Washington, DC: ASM Press. 2000. p.595-627.

FU, Y.W.; HOU, W.Y.; YEH, S.T.; LI, C.H.; CHEN, J.C. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and

dietary administrations on shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.22, n.6, p.673-685, 2007.

GRAUFFEL, V.; KLOAREG, B.; MABEU, S.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. New natural polysaccharides with potent antithrombotic activity: fucans from brown algae. **Biomaterials**, v.10, p.363-369, 1989.

HAUTON, C.; SMITH, V.J. In vitro cytotoxicity of crustacean immunostimulants for lobster (*Homarus gammarus*) granulocytes demonstrated using the neutral red uptake. **Fish & Shellfish Immunology**, v.17, n.1, p.65-73, 2004.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M. SEYA, T. Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. **International Immunopharmacology**, v.2, n.4, p.423-434, 2002.

HONYA, M.; MORI, M.; ANZAI, M.; ARAKI, Y.; NISIZAWA, K. Monthly changes in the content of fucans, their constituent sugars and sulphate in cultured *Laminaria japonica*. **Hydrobiologia**, v.398, p.411-416, 1999.

HUANG, X.; ZHOU, H.Q.; ZHANG, H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharidae extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.20, n.5, p.750-757, 2006.

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 thermophilum*. **Aquaculture**, v.164, p.277– 288, 1998.

JEONG, H.J.; LEE, S.A.; MOON, P.D.; PARK, R.K.; UM, J.Y.; KIM, H.M., HONG, S.H. Alginic acid has anti-anaphylactic effects and inhibits inflammatory cytokine expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation. **Clinical and Experimental Allergy**, v.36, n.6, p.785-794, 2006

JOLY, A.B. **Gêneros de algas marinhas da Costa Atlântica Latina Americana**. 1.ed. São Paulo : Editora da Universidade Federal de São Paulo, 1967. 406p.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. Cell walls of marine algae: structure and function, **Oceanog. Marine Biol**, v.26, p.259–315, 1988.

KUMMERER, K.; AL-AHMAD, A.; MERSH-SUNDERMANN, V. Biodegradability of some antibiotics, elimination of their genotoxicity and affection of waste water bacteria in a simple test. **Chemosphere**, v.40. p.701-710, 2004.

LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheology of industrial polysaccharides - theory and applications**. Gaithersburg: Aspen Publishers. 1999. 620p.

LE MOULLAC, G.; SOYEZ, C.; SAULNIER, D.; ANSQUER, D.; AVARRE, J.C.; LEVY, P. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, p.621–629, 1998.

LEE, S.Y.; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, v.12, p.421-437, 2002.

LEE, Y.K.; CHEW, P.F.; SOH, B.S.; THAM, L.Y. Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus merguensis* by feeding *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v.15, n.4, p.279-287, 2003.

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

LEITE, E.L.; MEDEIROS, M.G.L.; ROCHA, H.A.O.; FARIAS, G.G.M.; SILVA, L.F.; CHAVANTE, S.F.; ABREU, L.D.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Structure and pharmacological activities of a sulfatedxylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schroederi*. **Plant Science**, v.132, p.215-228, 1998.

LENOCH, R. **Avaliação do risco epidemiológico da carcinicultura catarinense usando como modelo e Síndrome de Taura e a Doenças da Mancha Branca**. Itajaí, 2004. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade do Vale Itajaí, Itajaí, 2004.

MABEAU, S.; KLOAREG, B.; JOSELEAU, J.P. Fractionation and analysis of fucans from brown algae. **Phytochemistry**, v.29, p.2441-2445, 1990.

MACMILLAN, J. R. Aquaculture and antibiotic resistance: a negligible public health risk. **World Aquaculture**, v.32, n.2, p.49-51, 2001.

MELO, M.R.S.; FEITOSA, J.P.A.; FREITAS, A.L.P.; PAULA, R.C.M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, v.49, n.4, p.491-498, 2002.

MOE, S. T.; DRAGET, K. I.; SKAJAK-BRAEK, G.; SMIDSROD, O. Alginates. In: STEPHEN, A. M. (Ed) **Food Polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker. 1995. p. 245-286.

MONTERO-ROCHA, A.; MCINTOSH, D.; SÁNCHEZ-MERINO, R.; FLORES, I. Immunostimulation of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following dietary administration of Ergosan. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.91, p.188-194, 2006.

MOURÃO, P.A.S.; BASTOS, I.G. Highly acidic glycans from sea cucumbers. **Eur. Journal of Biochemistry**, v.166, p639-645, 1987.

MULLOY, B.; RIBEIRO, A.C.; ALVES, A.P.; VIEIRA, R.P.; MOURÃO, P.A.S. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the O-2 and O-4 positions. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.22113-22123, 1994.

MULLOY, B.; MOURÃO, P.A.S.; GRAY, E. Structure and function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **Journal of Biotechnology**, v.77, p.123-135, 2000.

MUÑOZ, M.; CEDEÑO, R.; RODRIGUEZ, J.; VAN DER KNAAP, W.P.; MIALHE, E.; BACHÈRE, E. Measurement of reactive oxygen intermediate production in hemocytes of penaid shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.191, p.89-107, 2000.

NAIR, R.; CHABHADIYA, R.; CHANDA, S. Marine algae: screening for a potent antibacterial agent. **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v.7, n.1, p.73-86, 2007.

NAPPI, A.J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioassays**, v.22, p.469-480, 2000.

NAPPI, A.J.; VASS, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. **Pigment Cell Research**, v.6, p.117-126, 1993.

NUNES, A. J. P. **Princípios para boas práticas de manejo na engorda de camarão marinho no estado do Ceará**. Fortaleza: UFC, 2005. 109p.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Panorama da aqüicultura**, v.12, p.23-33, 2003. Disponível em: <[www.panoramadaaquicultura.com.br](http://www.panoramadaaquicultura.com.br)>. Acesso em: 14 de jun. 2007.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). International Committee. *Report of the meeting of the OIE aquatic animal health standards commission*. Paris, 2006. Disponível em : <[http://www.oie.int/download/SC/2006/A\\_AAC\\_MARCH2006.pdf](http://www.oie.int/download/SC/2006/A_AAC_MARCH2006.pdf)>. Acesso em: 15 dez.2007.

OSTRENSKY, A. **Estudos para viabilização dos cultivos comerciais de camarões marinhos no litoral do Estado do Paraná, Brasil**. 1997. 235 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In: **The Polysaccharides**. New York: Academic Press. 1983. v.2, 195p.

PARACER, S.; TARJAN, A.C.; HODGSON, L.M. Effective use of marine algal products in the management of plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v.19, n.2, p.194-200, 1987.

PATANKAR, M. S.; OEHNINGER, S.; BARNETT, T.; WILLIAMS, R. L.; CLARK, G. F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 29, p. 21770-21776, 1993.

PERCIVAL, E.G.V.; ROSS, A.G. The isolation and purification of fucoidin from brown seaweeds. **J. Chem. Soc.**, p.717-720, 1950.

PERCIVAL, E.; MACDOWELL, R.H. **Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1967. 219p.

PEREIRA, A.P.; RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Extração e otimização de rendimento dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Sargassum sp.* In: VI ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO/VI ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DO CEFET-CE, 6., 2006, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: CEFET, 2006. p.33-37.

PEREZ-FARFANTE, I. & KENSLEY, B.F. Penaeoid and sergestoid shrimp and prawns of the world: key of diagnosis to the families and genera. **Museum National d'Histoire Naturelle**, Paris, v. 175, 1997. 233p.

PLATAFORMA TECNOLÓGICA DO CAMARÃO MARINHO CULTIVADO. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento, CNPq, ABCC, 2001. 276p.

PONTES, G.C. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis***. 2005. 30f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

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. 7., 2000, Yucatan. **Anais eletrônicos...** Yucatan: Mérida, 2000. p. 47-56. Disponível em: <[www.educacion.uanl.mx/publicaciones/maricultura/acuiculturaV/raa.pdf](http://www.educacion.uanl.mx/publicaciones/maricultura/acuiculturaV/raa.pdf)>. Acesso em: 11 de jul. 2007.

RIVIERA, G.; YOONG, F.; RIOFRIO, G.B.; REINOSO, B.; HURTADO, F.; MASSUH, P. Inclusion de harina de kelp (*Macrosystis pyrifera*) em alimentos balanceados para camarón. In: I CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE AQUICULTURA, 1., 2002. **Anais eletrônico...**2002, p.244-252. Disponível em: <[www.civa2002.org](http://www.civa2002.org)> . Acesso em: 17 set. 2007.

ROCHA, F.D.; SOARES, A.R.; HOUGHTON, P.J.; PEREIRA, R.C.; KAPLAN, M.A.; TEIXEIRA, V.L. Potential cytotoxic activity of some Brazilian seaweeds on human melanoma cells. **Phitotherapy Research**, v.21, n.2, p.171-175, 2007

ROCHA, H.A.O. **Extração e purificação de uma fucana da alga marinha *Spatoglossum schroederi***. São Paulo, 1998. 85 p. Dissertação (Pós-graduação em Biologia) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1998.

ROCHA, H.A.O.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S.; CARVALHO, L.C.M.; VEIGA, S.S.; LEITE, E.L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p. 621-626, 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.

ROCHA, H.A.O.; BEZERRA, L.C.L.M.; ALBUQUERQUE, I.R.L.; COSTA, L.S.; GUERRA, C.M.P.; ABREU, L.D.; NADER, H.B.; LEITE, E.L. A xylogalactofucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederii* stimulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial cells. **Planta Médica**, v.71, n.4, p. 379-381, 2005a.

ROCHA, H.A.O.; MORAES, F.A.; TRINDADE, E.S.; FRANCO, C.R.C., TORQUATO, R.J.S.; VEIGA, S.S.; VALENTE, A.P.; MOURÃO, P.A.S.; LEITE, A.L.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Structural and haemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schröderi*. An ideal antithrombotic agent? **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n.50, p.41278-41288, 2005b.

ROCHA, I.P.; RODRIGUES, J.A. A carcinicultura brasileira em 2003. **Revista da ABCC**, Recife, ano 5, n.1, p.30-45, 2003.

ROCHA, I.P.; RODRIGUES, J.A. A carcinicultura brasileira em 2003. **Revista da ABCC**, Recife, ano 6, n.1, p.30-36, 2004.

ROCHA, I.P. **Entraves e Soluções para a Recuperação da Competitividade da Carcinicultura Brasileira**. Palestra apresentada no XI Seminário Nordeste de Pecuária – PECNORDESTE 2007. Disponível em: <[www.pecnordeste.com.br/doc/aquipescas/Entraves%20e%20Solu%C3%A7%C3%B5es%20para%20a%20Recupera%C3%A7%C3%A3o%20da%20Competitividade%20da%20Carcinicultura%20lamar%20de%20Paiva%20Rocha.pdf](http://www.pecnordeste.com.br/doc/aquipescas/Entraves%20e%20Solu%C3%A7%C3%B5es%20para%20a%20Recupera%C3%A7%C3%A3o%20da%20Competitividade%20da%20Carcinicultura%20lamar%20de%20Paiva%20Rocha.pdf)> Acesso em: 26 de jun.2007.

RODRIGUES, J. Carcinicultura Marinha - Desempenho em 2004. **Revista da ABCC**, ano7, n.2, p.38, 2005.

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

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***. Fortaleza,

2006. 77f. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

RODRIGUEZ, J.; MOULLAC, G.L. State of the 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*. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, n.23, p.13369-13372, 1989.

SAKAI, M. Current research status of fish immunoestimulants. **Aquaculture**, v.172, p.63-92, 1999.

SANTOS, M. L. **Programa de biossegurança para fazendas de camarão marinho**. Recife: ABCC, Associação Brasileira de Criadores de Camarão, 2005. 61p. Disponível em: <[www.abccam.com.br/download/MANUAL%20DE%20BIOSSEGURAN%C7A.pdf](http://www.abccam.com.br/download/MANUAL%20DE%20BIOSSEGURAN%C7A.pdf)>. Acesso em: 23 de ago. 2007.

SAULINER, D.; HAFFNER, P.; GOARANT, C.; LEVY, P.; ANSQUER, D. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v.191, p.133-144, 2000.

SENAPIN, S; PHEWSAIYA, K; BRIGGS, M; FLEGEL, T.W. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**, v. 266, p.32-38, 2007.

SILVA, P.I. **Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana***. 2000. 169f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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.

SÖDERHÄLL, K. Crustacean immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v.21, n. 2, p.205, 1997.

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

SONG, Y.L.; HUANG, C.C. **Application of immunostimulants to prevent shrimp diseases**. In: FINGERMAN, M.; NAGABHUSHANAM, R. (eds.). Recent Advances in Marine Biotechnology. Science Publishers. p. 173-188, 2000.

SOULAP, E. **Nuevas alternativas de cultivos acuícolas**. 1 Ed. Guayaquil: Ed. Ener Soulap, 1999. 442 p.

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

SUNG, H.H.; KOU, G.H.; SONG, Y.L. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish Pathology**, v.29, n.1, p.11-17, 1994.

SUNG, H.H.; YANG, Y.L.; SONG, Y.L. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, via immunostimulation. **Journal of Crustacean Biology**, v.16, p.278-84, 1996.

TACKAERT, W.; ABELIN, P.; LEGER, P. H.; SORGELOOS, P. Stress resistance as a criterion to evaluate quality of postlarval shrimp reared under different feeding procedures. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE CULTIVO DE CAMARÃO, 3., 1989, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: MCR Aquacultura, 1989.

TAKAHASHI, Y; UEHDA, K.; WATANABE, R.; OKUMURA, T.; YAMASHITA, T.; OMURA, H.; KAWANO, T.; KANEMITSU. A.; NARASAK, H.; SUSUKI, 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, 1., 1998, Bangkok. **Anais...**Bangkok, 1998. p. 171-173.

TALARICO, L.B.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIAS, P.C.S; SCOLARO, L.A.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; PUJOL, C.A.; DAMONTE; E.B. Anti-herpes simplex vírus activity of sulfated galactanas from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulares*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.34, n.1-2, p.63-71, 2004.

TAVARES, E.C.B.; SANTOS, M.A.S. Estudo exploratório da cadeia produtiva da carcinicultura no estado do Pará: o caso do *Litopenaeus vannamei*. **Amazônia: Ci. & Desenv.**, v. 1, n. 2, 2006. P.85-96. Disponível em: <[http://www.bancoamazonia.com.br/bancoamazonia2/Revista/cienciaedesenvolvimento\\_02/Amazonia\\_Ciencia\\_Desenvolvimento\\_8596.pdf](http://www.bancoamazonia.com.br/bancoamazonia2/Revista/cienciaedesenvolvimento_02/Amazonia_Ciencia_Desenvolvimento_8596.pdf)> Acesso em: 14 de dez. 2007.

TAYLOR, W.R. **Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Américas**. The University of Michigan Press, 1960, 870p.

TEIXEIRA, V.L.; ROCHA, F.D.; HOUGHTON, P.J.; KAPLAN, M.A.C.; PEREIRA, R.C.  $\alpha$ -Amylase inhibitors from Brazilian seaweeds and their hypoglycemic potential. **Fitoterapia** , v.78, n.1, p.35-36, 2007.

TORO, C.R. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarão *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. Curitiba, 2005. 173f. Tese



(Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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

VADSTEIN, O; OIE, G.; OLSEN, Y.; SELVESEN, I.; SKJERMO, J.; SKJAK-BRAEK, G. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. In: PROCEEDINGS OF THE 1ST INTERNATIONAL CONFERENCE ON FISH FARM TECHNOLOGY, 1993, Rotterdam. **Anais...** Rotterdam: Balkema, 1993. p.69–75.

VAN DE BRAAK, K. **Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)**. **Wageingen**, 2002. 168f. Tese (Doutorado em Biologia), Universidade de Wageingen, Wageingen, 2002 Disponível em: <[www.library.wur.nl/wda/dissertations/dis3218.pdf](http://www.library.wur.nl/wda/dissertations/dis3218.pdf)>. Acesso em: 01 de jul. 2007.

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

VASQUEZ, L.; SIERRA, C; JUÁREZ, S; AGUNDIS, C.; ZAVALA, A.; CENTENO, E. Mecanismos de inmunidad en crustáceos. **Interciencia**, v.23, n.6, p.1-5, 1998.

VENKATESWARLU, S.; PANCHAGNULA, G.K.; GOTTUMUKKALA, A.L.; SUBBARAJU, G.V. Synthesis, structural revision, and biological activities of 4'-chloroaurone, a metabolite of marine brown alga *Spatoglossum variabile*. **Tetrahedron**, v.63, n.29, p.6909-6914, 2007.

VON HOLDT, M.M.; LIGTHELM, S.P.; NUNN, J.R. South African seaweeds: seasonal variations in the chemical composition of some phaeophyceae. **J. Sci. Food Agr.**, v.6, p.193-197, 1955.

WAKSMAN, S.A.. Liebig-The Humus Theory and the Role of Humus in Plant Nutrition. In: MOULTON, F.R. (ed.). **Liebig and after Liebig**. Amer. Assn. Adv. Sci. Special Publ. 16, Washington, p. 56-63, 1942

WANG, H.; OOI, E.V.; ANG, P.O. Antiviral polysaccharides isolated from Hong Kong brown seaweed *Hydroclathrus clathratus*. **Science in China**, v.50, n.5, p.611-618, 2007.

WARNER, H.R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.3, p.249-258, 1994.

WASIELESKY, W. J. **Cultivo de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda Penaeidae) no estuário da Lagoa dos Patos: Efeitos**

**de parâmetros ambientais e manejo de cultivo.** Rio Grande, 2000, 199p. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2000.

XUAN LE, T.; MUNEKAGE, Y. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam. **Marine Pollution Bulletin**, v.49, p.922-929, 2004.

YEH, M.S.; CHEN, Y.L.; TSAI, I.H. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121B, p. 169-176, 1998.

YEH, S.T.; LEE, C.S.; CHEN, J.C. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.20, n.3, p.332-345, 2006.

YOON, S.J.; PYUN, Y.R.; HWANG, J.K.; MOURÃO, P.A. A sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* has mainly heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. **Carbohydrate research**. 2007. No prelo.

YU, P.Z.; LI, N.; LIU, X.G.; ZHANG, Q.B.; LI P.C. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa*. **Pharmacological Research**, v.48, n.6, p.543-549, 2003.

YUAN, Y.V.; WALSH, N.A. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. **Food Chemical Toxicology**, v.44, n.7, p.1144-1150, 2006.

ZHOU, G; SUN, Y.P.; XIN, H.; ZHANG, Y.N.; LI, Z.; XU, Z.H. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambdacarrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v.50, n.1, p.47-53, 2004.

