



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

RENATO TEIXEIRA MOREIRA

**CULTIVO DE *Arthrospira platensis* EM MEIO ORGÂNICO: EXTRAÇÃO DE
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E SUA ADMINISTRAÇÃO A CAMARÕES
*Penaeus vannamei***

FORTALEZA

2015

RENATO TEIXEIRA MOREIRA

**CULTIVO DE *Arthrospira platensis* EM MEIO ORGÂNICO: EXTRAÇÃO DE
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E SUA ADMINISTRAÇÃO A CAMARÕES
*Penaeus vannamei***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Engenharia de Pesca do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto.

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciane Maria Perazzolo.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- M839c Moreira, Renato Teixeira.
 Cultivo de *Arthrospira platensis* em meio orgânico: extração de polissacarídeos sulfatados e sua administração a camarões *Penaeus vannamei* / Renato Teixeira Moreira. – 2015.
 67 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias,
 Departamento de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca,
 Fortaleza, 2015.
 Área de Concentração: Biotecnologia de Recursos Aquáticos.
 Orientação: Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto.
 Coorientação: Profª. Dra. Luciane Maria Perazzolo.
1. Camarão - Criação. 2. Camarão - Imunoestimulação. 3. Polissacarídeos - Adjuvantes
 imunológicos. I. Título.

CDD 639.2

**CULTIVO DE *Arthrospira platensis* EM MEIO ORGÂNICO: EXTRAÇÃO DE
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E SUA ADMINISTRAÇÃO A CAMARÕES
*Penaeus vannamei***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Engenharia de Pesca do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Luciane Maria Perazzolo (Co-Orientador)
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Aldeney Andrade Soares Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Glacio Souza Araújo
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Dedico este trabalho ao Prof. Doutor Wladimir Ronald Lobo Farias, pelos ensinamentos, amizade e pelo exemplo de profissional, pesquisador e professor que sempre demonstrou.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias, por me apoiar e me conduzir nesta vida acadêmica, pela dedicação e atenção durante todos estes anos desde a graduação até o momento em que me tornei professor, sempre um grande amigo, incentivador e eterno orientador.

A Prof^a. Dr^a. Luciane Maria Perazzolo, que sempre me apoiou, passou conhecimento, incentivou e tranquilizou, principalmente, nesta reta final.

Ao Prof. Dr. Manuel Antonio de Andrade Furtado Neto, por ter aceitado me orientar na reta final de conclusão, acreditar no trabalho e incentivar.

Aos Profs., Dr. Alexandre Holanda Sampaio e Dra. Silvana Saker Sampaio, pela ajuda, amizade, orientação e incentivo ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Aldeney Andrade Soares Filho, pelo apoio e a valorosa contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Glacio Souza Araújo, por contribuir na avaliação deste estudo.

Aos amigos que contribuíram diretamente na realização deste trabalho, Hudson Maia, Anderson Alan, João Henrique, Antonio Glaydson, William Alves e Luís Paulo.

A Prof^a. Dr^a. Regine Helena e seu orientando Rafael dos Santos, pela ajuda e realização dos ensaios microbiológicos.

A minha esposa Sarah Maria e minha filha Lourdes Maria, pela paciência, apoio, cobrança, carinho, amor, por sofrer e sorrir ao meu lado, dos momentos mais difíceis até hoje. Vocês são a razão de tudo!!!

Aos meus pais Amilcar Moreira e Rita Teixeira, e meus irmãos Eduardo Teixeira e Amilcar Júnior, pelo incentivo, sempre.

Aos meus sogros Mauro César e Maria Ivanilce e ao meu cunhado Pedro Mauro, pelo apoio, incentivo e a amizade construída durante todos estes anos.

A todos os funcionários e servidores da UFC e do IFCE, que de forma indireta e direta apoiaram a execução deste trabalho.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

(Cora Coralina).

RESUMO

A aquicultura ocupa cada vez mais espaço no cenário mundial, em virtude do avanço tecnológico e do aumento da demanda por proteína animal, consolidando-se como a atividade que mais cresce no agronegócio. Por outro lado, existe a possibilidade do desenvolvimento de enfermidades ao longo do cultivo, bem como, causar impactos no meio ambiente, com o lançamento de compostos orgânicos na água, eutrofizando o ecossistema aquático. Diante deste cenário, as cianobactérias como a *Arthrospira platensis*, surgem como um forte aliado dos produtores, seja para absorção de compostos orgânicos e tratamento de efluentes, seja pela produção de compostos que apresentam atividade biológica, promovendo o bem-estar dos animais cultivados. Assim, o objetivo desse estudo foi produzir *A. platensis* em efluente de cultivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), extrair e avaliar o efeito imunomodulador dos polissacarídeos sulfatados (PS) em juvenis de *Penaeus vannamei*. Os PS foram obtidos a partir de um extrato aquoso quente e administrados por meio de banhos de imersão em juvenis de *P. vannamei*, nas concentrações de 0, 60, 120 e 240 mg L⁻¹. Após a imersão, foi realizada a contagem total de hemócitos (THC) e verificada a concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP) e atividade das enzimas fenoloxidase (PO) e α 2-macroglobulina no soro. Após a avaliação dos imunoparâmetros, verificou-se que na concentração de 120 mg L⁻¹ ocorreu a melhor atividade imunestimulante. Esta concentração foi utilizada para se observar a reação dos parâmetros imunológicos quando expostos ao tempo 0 (sem exposição), 45, 90, 135 e 180 minutos, bem como a atividade antimicrobiana contra *Vibrio alginolyticus*. A microalga mostrou um bom desenvolvimento dentro do sistema de produção orgânico. Foram extraídos 19,85 g de PS, com um rendimento de 8,5% da biomassa utilizada. Durante o fracionamento dos PS foram observados duas frações majoritárias com 0,5 e 1,2 M de NaCl. Após três horas de imersão em diferentes concentrações de PS, os imunoparâmetros apresentaram um aumento gradativo à medida que se elevava a concentração dos PS. Ainda, a estimulação do sistema imunológico dos camarões ocorreu com 90 e 135 minutos de exposição aos PS. A enzima fenoloxidase atingiu sua atividade máxima (72,33 Umin⁻¹mg⁻¹) com 135 minutos de exposição, seguida de um aumento da atividade da enzima α 2-macroglobulina com 180 minutos. O soro dos animais coletados com 90 e 135 minutos foi mais efetivo em inibir o desenvolvimento de *V. alginolyticus*, sendo necessários apenas 1,51 \pm 0,08 e 1,59 \pm 0,02 mg mL⁻¹ de proteínas para combatê-lo. Os resultados obtidos nos demais tempos não diferiram do tempo zero. Assim, conclui-se que os PS de *A. platensis* foram capazes de ativar o sistema imunológico dos camarões logo após 90 minutos de exposição, como também contribuíram para aumentar a atividade antibacteriana do soro dos animais.

Palavras-chave: *Penaeus vannamei*, *Arthrospira platensis*, polissacarídeos sulfatados, imunestimulação

ABSTRACT

Aquaculture takes up more and more space on the world stage, as a result of technological advances and increased demand for animal protein, consolidating itself as the fastest growing activity in agribusiness. On the other hand, there is the possibility of the development of illnesses over the cultivation, as well as impact on the environment, with the release of organic compounds in water, eutrophication of aquatic ecosystem. Given this scenario, microalgae *Arthrospira platensis*, as to appear as a strong ally of the producers, whether for absorption of organic compounds and treatment of effluents, is for the production of compounds that exhibit biological activity, promoting the welfare of farmed animals. Thus, the objective of this study was to produce. *platensis* cultivation sewage Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), extract and evaluate the immunomodulatory effect of sulfated polysaccharide (PS) in juvenile *Penaeus vannamei*. The PS were obtained from a hot aqueous extract and administered through immersion baths in juveniles of *P. vannamei*, at concentrations of 0, 60, 120 and 240 mg L⁻¹. After soaking, the total count of hemocytes (THC) and checked the concentration of total proteins (CP) and activity of enzymes phenoloxidase (PO) and α 2-macroglobulina. After the evaluation of the immunoparameters, it was found that the concentration of 120 mg L⁻¹ the best immunostimulating activity. This concentration was used to observe the reaction of immunological parameters when exposed to the weather (no exposure) 0, 45, 90, 135 and 180 minutes, as well as the antimicrobial activity against *Vibrio alginolyticus*. The microalgae showed a good development within the organic production system. Were extracted 19,85 g PS, with a yield of 8,5% of the biomass used. During the fractionation of PS were observed two fractions with 0,5 and 1,2 M majority of NaCl. After three hours of immersion in different concentrations of PS, the immunoparameters showed an increase gradually as amounting to concentration of PS. Still, stimulation of the immune system of shrimp took place with 90 and 135 minutes of exposure to the PS. The phenoloxidase enzyme reached its maximum activity (72,33 Umin⁻¹ mg⁻¹) with 135 minutes of exposure, followed by an increase of the α 2-macroglobulina enzyme activity with 180 minutes. The serum of animals collected with 90 and 135 minutes was more effective in inhibiting the development of *V. alginolyticus*, and needed only 1,51 \pm 0,08 and 1,59 \pm 0,02 mg mL⁻¹ of proteins to fight it. The results obtained in other times did not differ from time zero. Thus, it is concluded that the PS of *A. platensis* were able to activate the immune system in shrimp shortly after 90 minutes of exposure, but also contributed to increase the antibacterial activity of the serum of animals.

Keywords: *Penaeus vannamei*, *Arthrospira platensis*, sulphated polysaccharides, Immunoestimulation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do meio Jourdan modificado.	31
Tabela 2 - Parâmetros da qualidade da água, duas horas após a administração do PS de <i>A. platensis</i> na água de cultivo dos camarões.	43
Tabela 3 - Parâmetros imunológicos de juvenis de camarão <i>P. vannamei</i> após a três horas após a administração de PS de <i>A. platensis</i>	44
Tabela 4 - Parâmetros imunológicos de juvenis de camarão <i>P. vannamei</i> em diferentes tempos de imersão em solução contendo 120 mg L ⁻¹ de PS de <i>A. platensis</i>	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Pescado como alimento: oferta per capita (média 2008 – 2010).	16
Figura 2 -	Exemplo dos diversos tipos de cultivos de microalgas: A- cultivo indoor aberto; B- cultivo outdoor aberto; C- cultivo outdoor fechado; D- cultivo indoor fechado.	20
Figura 3 -	Esquema do desenho experimental. Fluxograma A – Mostra o sistema de produção da microalga <i>A. platensis</i> . Fluxograma B – Mostra as etapas para realização dos experimentos com os camarões <i>P. vannamei</i>	30
Figura 4 -	Sistema Integrado de cultivos de tilápia do Nilo e da microalga <i>Arthrospira platensis</i> em ambiente externo.....	32
Figura 5 -	Evolução da curva de crescimento da <i>S. platensis</i> cultivada efluente de tilápia do Nilo e redução das concentrações de amônia, nitrito, nitrato e fosfato.	40
Figura 6 -	Cromatografia em DEAE-celulose dos polissacarídeos sulfatados extraídos da biomassa seca de <i>Arthrospira platensis</i>	42
Figura 7 -	Contagem total de hemócitos (CTH) em juvenis de camarões <i>P. vannamei</i> três horas após o banho de imersão de PS de <i>A. platensis</i>	43
Figura 8 -	Contagem total de hemócitos (CTH) em juvenis de camarões <i>P. vannamei</i> após o banho de imersão de PS de <i>A. platensis</i> na concentração de 120 mg L ⁻¹	45
Figura 9 -	Atividade Antimicrobiana do soro dos camarões <i>P. vannamei</i> contra <i>V. alginolyticus</i> , nos diferentes tempos de imersão em solução contendo 120 mg L ⁻¹ de PS de <i>A. platensis</i>	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Importância da aquicultura	16
2.2 Produção de microalgas	18
2.3 <i>Arthrospira</i> (Spirulina) <i>platensis</i>	22
2.4 A atividade imunomoduladora dos polissacarídeos sulfatados	23
2.5 Considerações sobre o sistema imune dos crustáceos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Aquisição e cultivo da <i>A. platensis</i>	30
3.2 Cultivo de <i>A. platensis</i> em efluentes provenientes do cultivo de tilápia	31
3.3 Acompanhamento do desenvolvimento da cultura de <i>A. platensis</i> em efluentes do cultivo de peixes	33
3.4 Análises dos parâmetros de qualidade de água	33
3.5 Extração dos polissacarídeos sulfatados de <i>A. platensis</i>	34
3.5.1 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados	34
3.6 Efeito da solução contendo polissacarídeos sulfatados de <i>A. platensis</i> ministrada na forma de banho de imersão aos camarões	35
3.7 Coleta da hemolinfa e análise dos imunoparâmetros	36
3.7.1 Contagem total de hemócitos (CTH)	37
3.7.2 Atividade do inibidor de protease α 2-macroglobulina (α 2M)	37
3.7.3 Atividade da fenoloxidase (PO)	38
3.7.4 Concentração de proteínas totais do soro (CP)	38
3.7.5 Atividade antimicrobiana do soro	38
3.8 Análises estatísticas	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Tratamento dos efluentes de tilápia pelo cultivo <i>A. platensis</i>	40
4.2 Extração e fracionamento dos polissacarídeos sulfatados de <i>A. platensis</i>	41
4.3 Administração do PS de <i>A. platensis</i> a juvenis de <i>P. vannamei</i>	42
4.4 Avaliação das condições de saúde de juvenis de <i>P. vannamei</i>	43
4.4.1 Avaliação dos imunoparâmetros de <i>P. vannamei</i> em diferentes tempos da exposição dos camarões em solução contendo PS de <i>A. platensis</i>	44
5 DISCUSSÃO	47
5.1 Tratamento dos efluentes de tilápia pelo cultivo <i>A. platensis</i>	47
5.2 Extração e fracionamento dos polissacarídeos sulfatados de <i>A. platensis</i>	48
5.3 Avaliação de alguns imunoparâmetros em juvenis de <i>P. vannamei</i> imersos em água contendo polissacarídeos sulfatados de <i>A. platensis</i>	49

6 CONCLUSÃO.....55
REFERÊNCIAS.....56

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas (1980-2010) a produção proveniente da aquicultura se expandiu cerca de 12 vezes em comparação à produção inicial, com uma taxa média de crescimento anual de 8,8% (FAO, 2012).

A produção aquícola mundial alcançou seu ápice em 2010, produzindo 79 milhões de toneladas quando gerou uma receita de US\$ 125 bilhões. Assim, em torno de 600 espécies são cultivadas em 190 países, em uma diversidade de sistemas de produção, grau de intensificação e aparatos tecnológicos, gerando emprego para cerca de 660 a 820 milhões de pessoas em todo o mundo, algo em torno de 10 a 12% da população mundial (FAO, 2012). Segundo a FAO (2010), esta atividade vem crescendo em todo o mundo e a China continua sendo responsável pelas maiores produções.

Com o intuito de aumentar a produção, os cultivos foram cada vez mais intensificados, levando os organismos a condições de estresse o que facilita o surgimento de doenças oportunistas, causadas por bactérias e vírus podendo resultar, no caso dos últimos, em grandes mortalidades (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

A intensificação dos cultivos, em todos os empreendimentos aquícolas, aumenta a carga de compostos orgânicos que, uma vez dissolvidos na água, elevam os níveis de nutrientes de fácil assimilação por organismos fotossintetizantes. Dessa forma, o lançamento de efluentes da aquicultura intensiva pode resultar em vários impactos negativos para os ambientes aquáticos, tornando-os passíveis de eutrofização (LIMA, 2011) e, conseqüentemente, em danos aos organismos cultiváveis, sendo necessário seu tratamento antes de serem lançados nos mananciais.

Segundo Boyd (2003), os potenciais impactos ambientais provenientes da intensificação da aquicultura têm aumentado a preocupação da sociedade quanto à sustentabilidade da própria atividade, uma vez que pode ocorrer a degradação de ambientes aquáticos através dos efluentes oriundos dos cultivos, cada vez mais ricos em nutrientes, com quantidades significativas de N (nitrogênio) e P (fósforo), levando ainda restos de rações, fertilizantes agrícolas e produtos de origem veterinária.

A adoção do sistema intensivo na produção traz alguns problemas de ordem sanitária que são cada vez mais corriqueiros no cultivo, sendo necessário um programa de monitoramento das condições de higiene dos animais cultivados (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). Mudanças no meio externo modificam a homeostase dos animais, tendo como

consequências alterações fisiológicas, endócrinas e respostas imunológicas, e, segundo Nardocci *et al.* (2014), diferentes respostas imunológicas ajudam a mitigar os efeitos do estresse a nível celular. Quando este processo falha, os indivíduos sofrem mais para manter seu equilíbrio com o ambiente, produzindo condições satisfatórias para o surgimento de patologias (McEWEN; GIANAROS, 2011). A resposta aos fatores que gera o desequilíbrio na homeostase de um organismo é chamada de estresse e os estímulos que o geram são os agentes estressores (McEWEN; WINGFIELD, 2010).

Diversos pesquisadores vêm criando medidas para evitar ou mitigar o efeito de agentes externos que possam comprometer o sucesso do cultivo. A inclusão de aditivos nas dietas dos organismos cultivados é uma estratégia recente e vem ganhando considerável atenção (IBRAHEM; MOHAMED; IBRAHIM, 2013).

A biotecnologia aplicada às algas tem resultado em grandes avanços, principalmente no decorrer das últimas três décadas. Alguns gêneros de microalgas como *Botryococcus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* e *Arthrospira (Spirulina)* são atualmente cultivadas para produção de proteínas e pigmentos com astaxantina e o β -caroteno, glicerol, biocombustíveis, fármacos, além de outros compostos químicos finos (SPOLAORE *et al.*, 2006).

Atualmente, os potenciais usos biotecnológicos de polissacarídeos naturais alcançaram um maior reconhecimento devido à tendência global do mercado de substituir compostos sintéticos por produtos naturais e à crescente necessidade de compreensão das funções dos açúcares sulfatados (ARAD; LEVY-ONTMAN, 2010).

A imunestimulação em animais é principalmente de origem profilática já que os imunostimulantes promovem uma ação no sistema imune não específico, aumentando a resistência do hospedeiro contra doenças, que na maioria das vezes, são causadas por patógenos oportunistas (RAA, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo realizar o cultivo da microalga *Arthrospira (Spirulina) platensis* em efluente de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), bem como analisar os parâmetros abióticos do efluente antes e após seu uso como meio de cultivo para a microalga, extrair e quantificar os polissacarídeos sulfatados da *A. platensis* e, por fim, avaliar os imunomoparâmetros em juvenis do camarão *Penaeus vannamei*, imersos em solução contendo diferentes concentrações dos polissacarídeos sulfatados extraídos de *A. platensis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

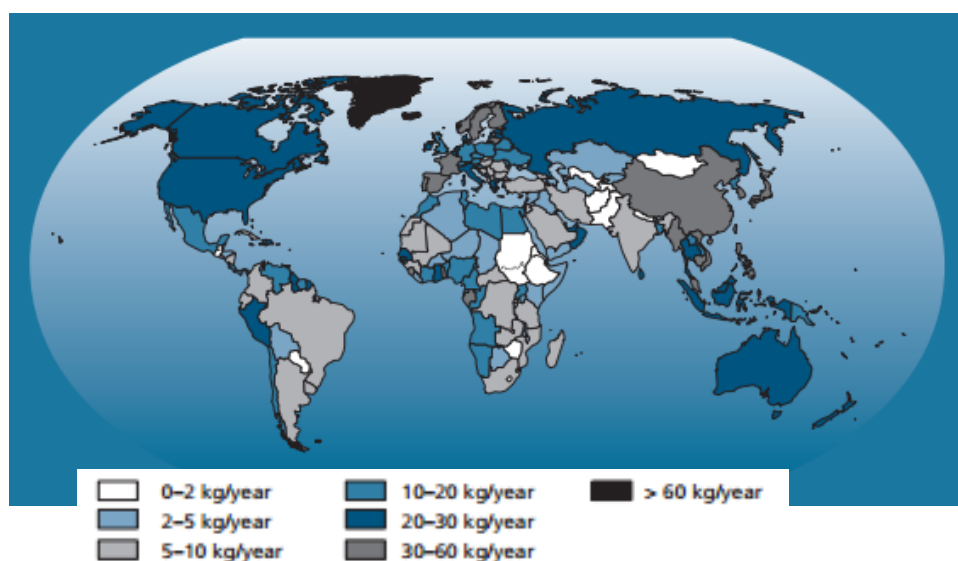
2.1 Importância da aquicultura

No Brasil, a definição de aquicultura está descrita na Lei nº 11.959, de junho de 2009, da Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e Pesca que define a aquicultura como sendo o cultivo ou a criação de organismos cujo ciclo de vida, em condições naturais, ocorre total ou parcialmente em meio aquático (BRASIL, 2009).

Com o declínio da produção pesqueira e o aumento da demanda de alimento pela população humana, a aquicultura tem apresentado um expansivo crescimento e sua participação na produção de alimentos deve aumentar ainda mais a fim de atender às demandas futuras por pescados (FAO, 2010). A perspectiva é que em 2021 a produção pesqueira total atinja 172 milhões de toneladas, das quais 79 milhões deverão ser produzidas pela aquicultura, representando um incremento de 33% nesse setor no período de 2012 -2021, contra apenas 3% de expansão da pesca no mesmo período (FAO, 2012).

De acordo com a FAO (2014), o consumo de pescado cresceu anualmente a uma taxa média de 3,2%, enquanto o crescimento populacional mundial está a 1,6%, sendo esse um dos fatores que contribuíram para o aumento do consumo per capita de 9,9 kg em 1960 para 19,2 kg em 2012 por ano (Figura 1), entretanto outros elementos como a ascensão da renda familiar, urbanização, e pela forte expansão da produção de peixe e canais de distribuição mais eficientes ajudaram a impulsionar este aumento do consumo.

Figura 1 – Pescado como alimento: oferta per capita (média 2008-2010).



Fonte: FAO (2014).

Conforme as últimas estatísticas, a produção aquícola mundial alcançou no ano de 2012, 66,6 milhões de toneladas, excluindo as plantas aquáticas e produtos não alimentares, oriundos da aquicultura.

A produção da aquicultura é praticamente toda voltada para a alimentação humana e, em escala mundial, foi responsável por 45,7% da produção total mundial de pescado em 2008. A Ásia e outras regiões do Pacífico contribuíram com 89% da produção mundial (FAO, 2010). Este desenvolvimento impressionante tem sido impulsionado por alguns fatores, tais como: aumento de renda da população e consequente poder de compra, bem como ao avanço tecnológico e canais de distribuição mais eficientes (FAO, 2014).

Com o avanço da tecnologia e o aumento da demanda por proteína animal, a aquicultura vem ocupando cada vez mais espaço no cenário mundial, se consolidando como a atividade que mais cresce no agronegócio. Em 2012, excluindo a produção de plantas aquáticas, o pescado contribuiu com o fornecimento de 158 milhões de toneladas de proteína animal, sendo 136,2 milhões de toneladas utilizadas para o consumo humano (FAO, 2014). Há muitos anos, a aquicultura vem sendo apontada como a solução mais viável de suprimento de pescado para atender sua crescente demanda mercadológica devido à redução constante da oferta de recursos naturais disponíveis (BOYD; TUCKER, 1998).

Segundo o Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura de 2012, do Ministério da Pesca e Aquicultura em parceria com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (BRASIL, 2012), a produção brasileira de pescados em 2010 (1.264.765 t) apresentou incremento de 2% em relação à produção de 2009 (1.240.813 t). A pesca extrativa marinha foi responsável por 536.455 t (42,4% do total de pescado), seguida, sucessivamente, pela aquicultura continental (394.340 t; 31,2%), pesca extrativa continental (248.911 t; 19,7%) e aquicultura marinha (85.057 t; 6,7%). Neste mesmo ano, a região Nordeste foi responsável pela maior produção de pescado do País (410.532 t), correspondendo a 32,5% da produção nacional. Deste total, 145.906,4 t (35,5%) foram provenientes da aquicultura, tendo os estados do Mato Grosso, Paraná e Ceará como os principais produtores nacionais.

No Brasil, a aquicultura é uma atividade pecuária em expressiva evolução nos últimos anos, com incremento na produção de mais de 35% na última década. O crescimento da produção aquícola continental foi de aproximadamente 40% no último triênio (2008-2010) o que correspondeu a 38% da produção total de pescados em 2010 (BRASIL, 2012).

A produção aquícola mundial de crustáceos, moluscos e peixes tem que aumentar para satisfazer a demanda crescente por pescados (GJEDREM; ROBINSON; RYE, 2012) e também para compensar a redução da captura proveniente da pesca, pois algumas espécies já

se encontram sobre-exploradas (KALIKOSKI; SEIXAS; ALMUDI, 2009). Para aumentar a produção de pescado é necessário estimular o crescimento sustentável da aquicultura em grandes corpos hídricos, aumentando a área de produção em reservatórios onde já existem polos aquícolas e reaproveitando a água de cultivos em tanques e viveiros (KUBTIZA, 2011).

No entanto, deve-se levar em consideração que essa atividade ainda é muito dependente da pesca extrativa, já que necessita de uma grande quantidade de subprodutos da pesca como, por exemplo, a farinha e o óleo de peixe para o preparo de rações, o que pode ser um fator limitante já que os estoques pesqueiros naturais, em sua grande maioria, estão em estado de sobre-exploração ou bem próximos, impedindo o crescimento da produção pesqueira nos últimos anos (FAO, 2010). Sobre tudo a aquicultura é uma atividade que depende dos ecossistemas nos quais está inserida, diante do exposto, é impossível cultivar alguns organismos aquáticos, sem que haja alterações ambientais, porém é possível reduzir significativamente os impactos sobre o meio ambiente (CHEN *et al.*, 2015).

2.2 Produção de microalgas

As microalgas são organismos providos de clorofila *a* e outros pigmentos, capazes de realizar fotossíntese, constituindo o fitoplâncton. Estes microrganismos são classificados, em geral, quanto ao tipo de pigmento, a natureza química de seus produtos de reserva e pelos componentes de sua parede celular (TOMASELLI, 2004).

Há evidências da existência de microalgas desde o período pré-cambriano, aproximadamente há 3,5 bilhões de anos. Estes microrganismos, principalmente as espécies marinhas, são responsáveis pela produção e manutenção do oxigênio atmosférico (TAHMASEBI *et al.*, 2013).

Formam a base da cadeia trófica, sendo responsáveis por manter o equilíbrio ecológico, além de possuir importância econômica e social por manter a fauna, que é fonte de alimento para a humanidade (GAFFNEY; O'ROURKE; MURPHY, 2014). As microalgas são bastante utilizadas na aquicultura como alimento para pós-larvas de moluscos, peixes e crustáceos em decorrência da facilidade de cultivo, ao pequeno tamanho, acentuada velocidade de crescimento e alto valor de ácidos graxos polinsaturados (SUH *et al.*, 2015).

Os primeiros cultivos comerciais de microalgas foram realizados para fins alimentícios e surgiram no início dos anos 1960, no Japão, com o uso da clorofícea *Chlorella*, seguido de cultivos da cianofícea *Spirulina* nos anos 1970, no México, sendo esta última atualmente cultivada em mais de 22 países inclusive no Brasil. No entanto, os primeiros

relatos referentes ao consumo de microalgas pelo homem datam de 2000 anos atrás, quando chineses em tempos de escassez alimentar consumiam a microalga *Nostoc* numa tentativa de sobrevivência (SPOLAORE *et al.*, 2006). Há ainda relatos do consumo de diferentes espécies de cianobactérias do gênero *Spirulina* por povos Aztecas habitantes das proximidades do lago Texcoco, no México, e por tribos próximas do lago Chade na África, onde após a coleta de *blooms* superficiais, a biomassa seca era utilizada para preparos denominados de *tecuiltatl* no México e *dihé* na África (FAO, 2008).

A maior quantidade de indústrias envolvidas no cultivo de microalgas está instalada nos Estados Unidos e a Earthrise Nutritionals é a maior de todas as indústrias com 43 hectares, localizada no deserto Sokora na Califórnia. Na América do Sul, destaca-se o Grupo Solarium de Biotecnologia Adequada ao Desenvolvimento do Deserto, uma empresa chilena, localizada no deserto do Atacama, porém as maiores produções são encontradas na China onde, em 2004, foram produzidas 41.570 toneladas de biomassa de *Spirulina*, o que rendeu 16,6 milhões de dólares aos chineses (FAO, 2008).

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

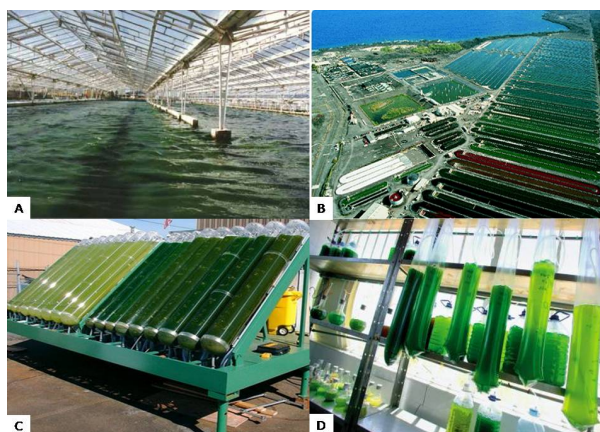
Nos últimos anos, com o crescente aumento da pressão pelo uso de fontes alternativas de combustíveis, foi despertado, mais uma vez, o interesse em se produzir microalgas como uma fonte renovável de biocombustíveis como metanol, biodiesel e biohidrogênio. Mesmo possuindo um custo de produção mais elevado que o de plantas superiores, o uso de microalgas para este fim torna-se viável, visto que não ocupa áreas agricultáveis destinadas a plantação de grãos para a alimentação (SUBHADRA; EDWARDS, 2010; SHIN *et al.*, 2015; MOHAN *et al.*, 2015). Além disso, podem ser capazes de acumular grande quantidade de compostos de valor comercial sob condições estressantes ou não, e ser produzidas em fotobiorreatores de escala industrial (OLAIZOLA, 2003).

Algumas espécies de microalgas podem produzir elevadas quantidades de biomassa e acumular grandes quantidades de compostos com atividade biológica, que podem

ser utilizados em diversas aplicações nos setores industrial, alimentício, de saúde, e energético (LEE; HAN, 2015). A composição algal varia de acordo com as condições ambientais, existindo espécies ricas em proteínas, polissacarídeos, pigmentos e ácidos graxos (GEORGE *et al.*, 2014).

De acordo com Coutteau (1996), as microalgas podem ser produzidas seguindo vários métodos, tipos de cultura e sistemas de cultivo. Dentre os métodos de produção podemos encontrar o estacionário ou “*batch*”, onde somente uma espécie é cultivada em recipientes contendo água fertilizada e as microalgas são completamente coletadas quando atingem seu máximo desenvolvimento; o semicontínuo, semelhante ao anterior, no entanto, ao atingir o seu ápice de desenvolvimento apenas metade das microalgas é coletada, sendo adicionado mais meio de cultivo; e o método contínuo em que a biomassa é coletada diariamente, ao mesmo tempo em que são adicionados mais nutrientes ao cultivo. As culturas podem ser do tipo axênicas quando estão completamente livres da presença de outros organismos como bactérias; xênicas permitindo a presença de bactérias; ou mistas com várias espécies de microalgas e ainda com a presença de bactérias. Quanto aos sistemas de cultivo, pode-se encontrar os realizados em ambientes internos (indoors) ou em ambientes externos (outdoors), em estruturas abertas ou fechadas. As estruturas abertas geralmente são utilizadas em ambientes externos para otimizar a captação de luz solar em tanques dos mais diversos tamanhos e em grandes *raceways*. As estruturas fechadas podem ser usadas tanto em ambientes externos como em internos e são compostas por tubos de vidro (fotobiorreatores), frascos, *carboys* ou grandes bolsões de plástico (Figura 2).

Figura 2 – Exemplos dos diversos tipos de cultivos de microalgas: A- cultivo *indoor* aberto; B- cultivo *outdoor* aberto; C- cultivo *outdoor* fechado; D- cultivo *indoor* fechado.



Fonte: www.google.com.br/images/microalgae.

As microalgas possuem uma alta eficiência na conversão de energia solar em compostos orgânicos com elevada energia química, pois elas podem converter mais de 5% da energia solar em biomassa (SCHENK *et al.*, 2008). Como necessitam apenas de luz solar e nutrientes para se desenvolverem, elas podem ser cultivadas em áreas não agricultáveis, utilizando água salobra ou água do mar, além de consumir o dióxido de carbono, um dos gases responsáveis pelo efeito estufa (WAHLEN; WILIS; SEEFELDT, 2011).

Devido aos altos rendimentos e o melhor crescimento em diferentes condições, quando comparados aos das plantas terrestres, as microalgas são atualmente consideradas como uma fonte de biomassa da terceira geração (POSTEN; SCHAUB, 2009). Ainda, são uma das mais interessantes fontes para ingredientes ou alimentos funcionais. Assim, o uso como fonte de alimentos funcionais tem se tornado uma prioridade, tanto para aumentar a produção destes organismos, como melhorando o custo-benefício dos sistemas de produção com o desenvolvimento de novas tecnologias, além de possuírem efeitos benéficos à saúde e cultivos ambientalmente corretos (BENELHADJ *et al.*, 2016).

Além da possibilidade de uso no tratamento de esgotos domésticos, as microalgas também podem ser utilizadas no tratamento de efluentes industriais, como no caso da vinhaça, obtida do processamento da cana-de-açúcar, cujo desenvolvimento pode ser acelerado pela adição de CO₂ à cultura e a biomassa resultante usada para gerar energia, a partir da produção de biogás (DOUSKOVÁ *et al.*, 2010). Além disso, as microalgas também possuem aplicações biológicas, como sua participação na ciclagem dos elementos químicos (VIDOTTI; ROLLEMBERG; 2004), reduzindo as concentrações de metais pesados de águas residuais, e incorporando-os na parede celular (RICHARDS; MULLINS, 2013).

Para reduzir os custos com a utilização de fertilizantes nos cultivos de microalgas, efluentes ricos em nitrogênio e fósforo podem ser usados como meio de cultivo, ao mesmo tempo em que elas reduzem a carga inorgânica e orgânica destes efluentes, proporcionando assim um método de tratamento biológico (biorremediação) de águas residuais de baixo custo (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Os elementos que mais limitam o seu crescimento são o nitrogênio, principalmente na forma de nitrato e amônia, e o fósforo na forma de fosfato (LOURENÇO, 2006). Compostos nitrogenados e fosfatados são nutrientes essenciais para formarem suas proteínas e membranas celulares, com isto, esses organismos removem elevadas quantidades destes compostos dos corpos hídricos, mitigando seus impactos negativos (CHANG; DUAN; XU, 2015). Estes compostos estão bastante presentes nas atividades aquícolas, provenientes dos restos alimentares, matéria orgânica e excretas dos animais cultivados.

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

A seleção da espécie de microalga para o cultivo deve levar em consideração sua capacidade de crescer rapidamente em meio orgânico sem perder suas características nutricionais, se adaptar bem ao cultivo externo em grandes escalas, ser facilmente separada da água por filtração, além de tolerar alterações de salinidade, temperatura e possuir valor comercial (SILVA, 2013).

Aquicultura integrada é considerado um elemento essencial de gestão do setor, visando reduzir, de forma econômica e socialmente benéfica, os impactos ambientais negativos da atividade, seja de água doce salina ou marinha. A integração multitrófica na aquicultura (IMTA), é uma das várias tecnologias de cultivo de organismos aquáticos que contribui para a mitigação de seus impactos (TROELL *et al.*, 2009). A IMTA utiliza organismos complementares para otimizar a ciclagem de nutrientes na aquicultura. Neste sistema, os resíduos gerados do cultivo de um organismo se torna fonte de energia para os outros organismos de outro nível trófico. Assim, o sistema tende a se deslocar em direção a um equilíbrio ecológico, sendo descritas, como fundamentais para se alcançar o desenvolvimento da sustentabilidade ambiental (RIDLER *et al.*, 2007).

2.3 *Arthrospira (Spirulina) platensis*

A microalga *Arthrospira platensis* ou comercialmente conhecida espirulina, é uma cianobactéria microscópica e filamentosa (LOURENÇO, 2006), de cor verde-azulada, e formadora de tricomas em espiral, de onde deriva seu nome (SILI; TORZILLO; VONSHAK, 2012).

Esta espécie é rica em proteínas (SABOYA, 2010) e, dependendo das condições de cultivo, poderá ser composta de 65 a 71% dessas macromoléculas na matéria seca, contendo todos os oito aminoácidos essenciais aos seres humanos. Apresenta cerca de 12 a 10% de carboidratos e lipídios, respectivamente, de acordo com as condições de cultivo

(LANLAN *et al.*, 2015). Além de possuir clorofila *a* e diversos minerais, é rica em ácidos graxos essenciais como o γ -linolênico, carotenóides e vitaminas do complexo B (YEGANEH; TEIMOURI; AMIRKOLAIE, 2015). A realização de vários estudos relatando as aplicações de compostos obtidos de *Spirulina* a tornaram uma potencial fonte de compostos nutracêuticos (ANDREWS *et al.*, 2011).

Dentre as atividades biológicas exercidas por tais compostos, pode-se citar a modulação do sistema imunológico, regulando as defesas inatas em camarões branco *Litopenaeus vannamei* (LIN *et al.*, 2010; TAYAG *et al.*, 2010); ações antioxidante e antiviral, redução de colesterol em ratos e coelhos (BERTOLIN *et al.*, 2009), atividade probiótica, efeitos contra a diabetes, controle da obesidade, melhoria da circulação sanguínea, proteção contra a toxicidade de metais pesados e outros compostos, bem como a proteção contra os efeitos da radiação solar. Além disso, existem relatos da prevenção de carcinomas orais em hamsters, aumento de microrganismos presentes na flora intestinal, sendo também utilizada no combate a desnutrição em crianças (AMBROSI *et al.*, 2008).

O extrato quente aquoso e os polissacarídeos obtidos de *A. platensis* possuem propriedades antioxidantes que podem inibir a replicação viral, o desenvolvimento de câncer e ainda aumentar a produção de anticorpos (BELAY, 2002). O uso de um extrato quente aquoso de *A. platensis* por via oral ativou o sistema imune inato humano pelo aumento na produção de interferon e aumentou a citotoxicidade das células *natural killer* (NK) (YEGANEH; TEIMOURI; AMIRKOLAIE, 2015).

Em organismos aquáticos cultivados, o uso de uma dieta enriquecida com a biomassa de *A. platensis* resultou em um aumento da atividade fagocítica e produção do ânion superóxido por células fagocitárias isoladas dos rins da carpa comum, *Cyprinus carpio* (WATANUKI *et al.*, 2006). A suplementação de dietas de peixes com *A. platensis*, não apresenta efeitos negativos no crescimento de peixes e melhora a pigmentação (TEIMOURI; AMIRKOLAIE; YEGANEH, 2013).

De acordo com os relatórios da FAO (2010), a produção dos cultivos de microalgas em águas continentais foi de 68.400 t em 2008, sendo praticamente toda de espirulina, principalmente oriunda da China (62.300 t) e o restante produzido no Chile (6.000 t). As produções comerciais de espirulina são, em geral, realizadas em grandes tanques externos, de fácil construção e que requerem poucos cuidados (LANLAN *et al.*, 2015).

2.4 A atividade imunomoduladora dos polissacarídeos sulfatados

Polissacarídeos sulfatados (PS) têm atraído a atenção internacional, devido as suas propriedades físico-químicas e pela alta atividade biológica (KURD; SAMAVATI, 2015). Segundo os autores, podem ser encontradas nas mais diversas fontes, desde plantas superiores, fungos, macro e microalgas. Polissacarídeos extraídos de frutas e vegetais tem atraído atenção de produtores e consumidores por suas propriedades físicas, por promoverem saúde e prevenção de doenças, além das aplicações nas indústrias de cosméticos e farmacêutica (MARAN; MEKALA; MANIKADAN, 2013).

Estudos com PS de macroalgas têm mostrado que suas estruturas variam de espécie para espécie e, às vezes, em diferentes partes da planta (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 PS pode possuir conformação estrutural única e, portanto, apresentar atividades biológicas diferentes ou mais potentes do que outros polissacarídeos, ou outros compostos já descritos. Além disso, diferentes métodos de extração podem, também, resultar em atividades biológicas distintas para 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 descoberta de um novo fármaco (ROCHA *et al.*, 2004).

Segundo Smith, Brown e Hauton (2003), cinco grupos de compostos com atividade imunoestimulante vêm sendo testados com sucesso na aquicultura, com resultados promissores na sobrevivência de crustáceos expostos experimentalmente a microrganismos patogênicos como bactérias vivas, antígenos bacterianos, glucanas, peptidoglicanas e lipopolissacarídeos. De acordo com Yeganeh, Teimouri e Amirkolaie (2015) fatores nutricionais, como vitaminas B e C e hormonais, como o hormônio do crescimento e a prolactina, também vêm sendo utilizados como imunoestimulantes.

A administração de imunoestimulantes pode aumentar a sobrevivência, bem como melhorar o crescimento de peixes e camarões (TALPUR; IKHWANUDDIN; AMBOK-BOLONG, 2015). Além de apresentarem um mínimo de efeitos colaterais e um melhor custo benefício em relação aos produtos comerciais (YEGANEH; TEIMOURI; AMIRKOLAIE, 2015). Vargas-Albores (2002) relatou que a avaliação da eficiência de um imunoestimulante depende de suas características farmacológicas, das condições fisiológicas do animal e das condições ambientais. Em camarões, por exemplo, existe a possibilidade dos animais não responderem ao tratamento com imunoestimulante devido à má nutrição ou ao comprometimento fisiológico com outros processos como, muda e reprodução. Por outro

lado, a falta de resposta também pode ocorrer pelo fato dos organismos se encontrarem saudáveis, bem alimentados ou em boas condições ambientais.

Takahashi *et al.* (1998) demonstraram a eficácia da administração oral do fucoidan, um PS extraído da alga marinha parda *Cladosiphon okamuranus*, no controle do vírus da mancha branca (WSSV) em camarões da espécie *Marsupenaeus japonicus*. Os autores mostraram que a administração de 60 e 100 mg kg⁻¹ d⁻¹ resultou em sobrevivências de 77 e 76%, respectivamente, enquanto os indivíduos do tratamento que não recebeu o fucoidan apresentaram 100% de mortalidade. Da mesma maneira, Chotigeat *et al.* (2004) relataram um aumento significativo da sobrevivência do camarão tigre-gigante *Penaeus monodon* infectado pelo WSSV, após administração oral do fucoidan extraído da alga marinha parda *Sargassum polycystum*.

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

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

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

Polissacarídeos sulfatados extraídos de algumas espécies de algas apresentam uma alta atividade antiviral contra vírus encapsulados, incluindo aqueles capazes de ser altamente patogênicos ao homem como o vírus da imunodeficiência humana. Essa atividade é baseada na formação de complexos similares aos dos vírus que os impedem de interagir com célula. Esses polissacarídeos podem ser obtidos em grandes quantidades e a baixos custos,

apresentando baixa toxicidade e, em alguns casos, poucos efeitos anticoagulantes (DAMONTE; MATULEWICZ; CERESO, 2004).

2.5 Considerações sobre o sistema imune dos crustáceos

Os camarões possuem uma relevância especial dentro do grupo dos crustáceos, dada a sua importância econômica na aquicultura mundial. Entretanto, o êxito desta atividade vem sofrendo graves limitações, devido ao surgimento de novas enfermidades, principalmente as de origem viral, que provocam mortalidade massiva e geram prejuízos de ordem econômica incalculáveis (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

Atualmente, a profilaxia e o controle das enfermidades durante os cultivos se limitam basicamente no manejo adequado e diminuição de condições que predisõem ao estresse, considerando que os fatores que determinam o estado de saúde dos camarões são pouco conhecidos. Neste contexto, o estudo do sistema imunológico dos crustáceos se sobressai como uma estratégia inovadora e promissora, que permite conhecer as bases da susceptibilidade e da resistência destes animais frente a microrganismos patogênicos e parasitas, além de proporcionar conhecimentos valiosos para estabelecimento de parâmetros de saúde e imunomarcadores para seleção genética de animais mais resistentes e ao desenvolvimento de compostos imunomoduladores (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

Entretanto, muito do que se conhece hoje sobre os parâmetros imunológicos de camarões, foi realizado em indivíduos juvenis e estágios adultos. Poucos são os relatos em fases larvais e pós-larvais, mesmo daquelas espécies de elevado interesse econômico (MARTÍN *et al.*, 2012).

Mudanças naturais do ambiente, diariamente ou sazonalmente, submetem os organismos ao sofrimento que, aliadas ao estresse ambiental causado pela presença de poluentes na água, são fatores determinantes para o surgimento e/ou o aumento no número de patógenos (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). Embora, apresentem um elevado crescimento, quando em salinidades abaixo do encontrado na água do mar, camarões *P. vannamei* mostram ser mais frágeis a infecções, visto que os níveis de moléculas imunoefetoras são encontrados em menor valor, junto com sua resistência aos agentes patogênicos. Tudo por conta de um maior gasto ou recrutamento energético para o crescimento, fazendo com que se reduza a oferta de energia para a manutenção do sistema imunológico (LIN *et al.*, 2012).

Os crustáceos, assim como outros invertebrados, só apresentam o sistema imune inato, não específico, diferente dos vertebrados que também apresentam um sistema imune adaptativo, ou específico. Assim, os crustáceos são incapazes de gerar defesas a longo prazo como resposta de vacinas específicas para invasores, porque seu sistema imune não possui memória imunológica (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

Em crustáceos, as respostas imunológicas no âmbito celular envolvem os hemócitos que são as células imunocompetentes e as reações humorais são desencadeadas por moléculas dissolvidas no plasma. Ambas respostas atuam em sinergismos para garantir a proteção do organismo contra agentes invasores (CANTELLI, 2009). As moléculas efetoras do sistema imune dos crustáceos (proteínas e peptídeos) são encontradas nos hemócitos, na hemolinfa, e em certos tecidos como as brânquias por exemplo (GROSS *et al.*, 2001).

Os principais sistemas de defesa reconhecidos nos crustáceos são a coagulação da hemolinfa, a melanização, o reconhecimento e aglutinação celular, os sistemas antibacterianos, antifúngicos e antivirais, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROIs, do termo em inglês, *Reactive Oxygen Intermediates*) e nitrogênio (RNIs, do termo em inglês, *Reactive Nitrogen Intermediates*) e os sistemas fagocítico e de encapsulamento (IWANAGA; LEE, 2005).

O reconhecimento dos patógenos pelo organismo dos crustáceos é feito mediante suas proteínas/receptores de reconhecimento-padrão ou P/RRPs que são responsáveis por diferenciar o próprio do não-próprio, reconhecendo os padrões moleculares específicos dos microrganismos ou M/PAMPs (*microbial/pathogen-associated molecular patterns*) (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

As PRPs são moléculas produzidas pelo hospedeiro e secretadas no plasma ou localizadas na superfície ou interior dos hemócitos que reconhecem e ligam-se os seus PAMPs respectivos. Os principais PAMPs reconhecidos pelas PRPs em crustáceos são os lipopolissacarídeos (LPS) da parede de bactérias Gram-negativas, as peptidoglicanas (PGs) da parede celular das Gram-positivas, as β -1,3-glicanas da parede de fungos e o dsRNA (*double-stranded RNA*) produzido durante a replicação de vários vírus (WANG; WANG, 2013).

Qualquer que seja o tamanho dos PAMPs que penetrem no organismo dos crustáceos, eles serão reconhecidos e ligados às suas PRPs específicas, acionando assim o gatilho para a ativação do sistema imune inato do animal que é iniciado pela degranulação dos hemócitos, desencadeando uma resposta imune-celular com a produção e liberação de uma série de moléculas imunoefetoras acompanhadas, ainda, pelo aumento da expressão de genes imunológicos específicos (BARRACCO, PERAZZOLO; ROSA, 2014).

Dentre as reações celulares de defesa, a primeira a ser ativada é a fagocitose. A destruição e neutralização dos microrganismos invasores fagocitados pelos hemócitos se deve à produção e liberação de moléculas altamente tóxicas, como as espécies reativas de oxigênio (ROIs, do inglês, *reactive oxygen intermediates*) e de nitrogênio (RNIs, do inglês *reactive nitrogen intermediates*). No momento do contato e reconhecimento do patógeno, a enzima NADPH-oxidase é ativada, ocorrendo assim um aumento significativo no consumo de oxigênio intracelular (ou *burst* respiratório) que resulta na produção de radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; MUÑOZ *et al.*, 2002). Estes radicais livres são espécies reativas com também para o hospedeiro e, como mecanismo de proteção, o animal produz concomitantemente várias enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutationa-peroxidase para neutralizar esse compostos (referencia ver no nosso capítulo 2014. A tua referencia estava incorreta)

Os crustáceos possuem estocados no grânulos de seus hemócitos, peptídeos antimicrobianos ou PAMs que funcionam como antibióticos naturais pois apresentam uma ação rápida e potente contra um amplo espectro de microrganismos, tais como bactérias, fungos filamentosos, leveduras e, em alguns casos, vírus e protozoários. Os PAMs são considerados de grande importância para o controle e prevenção de infecções nos crustáceos (BACHÈRE *et al.*, 2004; REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Estas proteínas e peptídeos geralmente apresentam uma ação detergente ou formadora de grandes poros, que levam ao desequilíbrio das funções da membrana, ou podem ainda entrar nas células, interferindo nas diferentes vias metabólicas essenciais ao ciclo de vida dos microrganismos (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004; TOKE, 2005). O mecanismo de ação dos PAMs é, portanto, provocar a desestabilização da membrana celular dos microrganismos invasores e, conseqüentemente, sua morte. Como os PAMs agem diretamente sobre a membrana das células, estrutura necessária para a sobrevivência dos microrganismos, os mecanismos de resistência para essas moléculas são praticamente inviáveis (BARRACCO; PERAZZOLO, ROSA, 2008).

Outra resposta imunológica dos crustáceos que se mostra bastante eficiente contra a invasão de microrganismos é o sistema de ativação da pró-fenolosidase ou sistema proPO. Este eficiente sistema de defesa consiste de uma variedade de proteínas que são produzidas em uma cascata proteolítica e são responsáveis por reações citotóxicas que ativam a fagocitose e resultam na formação de nódulos e cápsulas, apresentando como resultado final a

melanização (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SODERHALL, 2006). O sistema proPO é ativado pelos PAMPs dos patógenos, tais como LPS e β -1,3 glicanas, que invadem o organismo do hospedeiro.

O sistema proPO é composto por várias PRPs, muitas serino-proteases e seus zimógenos incluindo a pró-fenoloxidase e durante a ativação da cascata, vários compostos intermediários, como os ROIs, RNIs e as quinonas, são produzidos e liberados para a hemolinfa. Os compostos intermediários que são produzidos durante esse processo são as substâncias citotóxicas tanto para os microrganismos invasores, como para o hospedeiro e por este motivo, os animais contam com inibidores de proteases para garantir a ativação do sistema proPO apenas no local de injúria/infecção (ABELE; PUNTARULO, 2004). A etapa final do processo é a melanização, sendo que o pigmento melanina não tem função imunofetora, aparecendo possui, contudo, ação fungistática e sequestradora de radicais livres produzidos no processo (NAPPI; OTTAVIANI, 2000).

Os inibidores de proteases dos invertebrados que regulam a ativação do sistema proPO estão presentes tanto no plasma como nos hemócitos. Nos crustáceos o principal inibidor de protease é a pacifastina (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

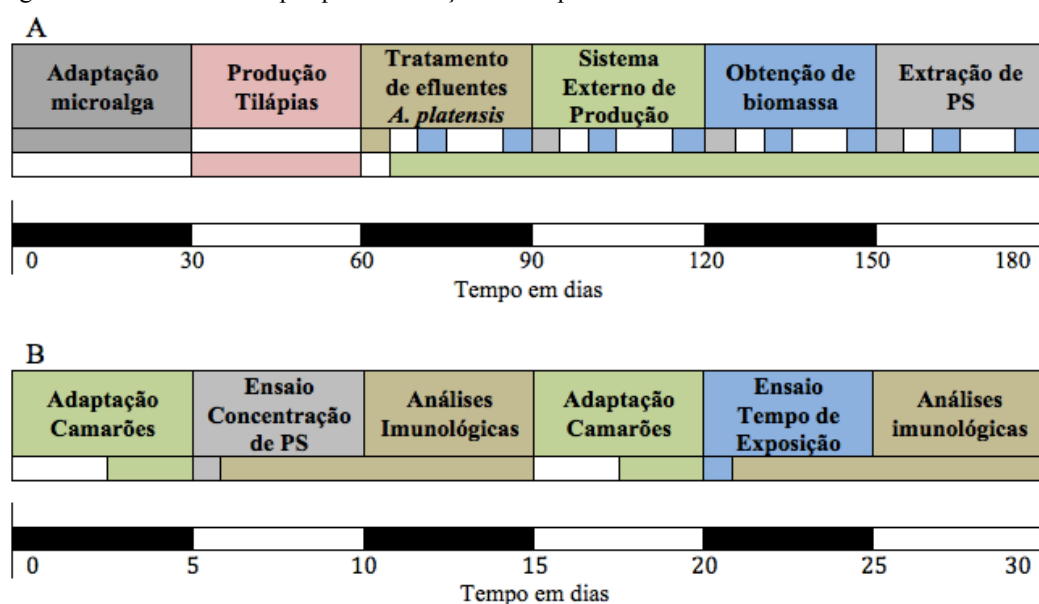
Outro inibidor de proteases que participa da regulação do sistema proPO dos peneídeos é a glicoproteína plasmática denominada α 2-macroglobulina (α 2M) que é constitutivamente sintetizada pelos hemócitos (GROSS *et al.*, 2001; RATTANACHAI *et al.*, 2004) e estocada nos grânulos dos hemócitos (Perazzolo *et al.*, 2011). Este inibidor apresenta um grande espectro de atuação inibindo tanto proteases exógenas produzidas pelos patógenos durante o processo infeccioso, como proteases endógenas produzidas pelo hospedeiro (ARMSTRONG, 2006).

Doenças em camarões, principalmente as virais, são uma das causas de efeitos negativos na economia em um grande grupo de países produtores deste organismo na Ásia e nas Américas do Sul e Norte. Estudos sobre a imunidade de camarões e outros crustáceos abrangem os aspectos gerais e consequências no sistema imune, buscando conhecer os mecanismos de resposta a doenças nestes animais (LIU; SÖDERHÄLL; JIRAVANICHPAISAL, 2009). A manutenção de um bom estado nutricional dos animais também apresentam relevância sobre os parâmetros imunológicos, uma que se faz necessário a presença de proteínas para a geração de moléculas que irão combater os agentes infecciosos (MARTÍN *et al.*, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nas dependências da Estação de Aquicultura Professor Dr. Raimundo Saraiva da Costa e no Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura (CEBIAQUA), ambos do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP), do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Ceará (UFC). O esquema geral das etapas experimentais está representado na Figura 3.

Figura 3 - Esquema do desenho experimental. Fluxograma A – Mostra o sistema de produção da microalga *A. platensis*. Fluxograma B – Mostra as etapas para realização dos experimentos com os camarões *P. vannamei*.



3.1 Aquisição e cultivo da *A. platensis*

A cepa de *A. platensis* foi obtidas do cepário de Planctologia do CEBIAQUA e mantida em meio Jourdan modificado (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição química do meio Jourdan modificado.

Reagentes	Quantidades (g L ⁻¹)
Uréia (CH ₄ N ₂ O)	0,07
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,2
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0,005
Sulfato de potássio (K ₂ SO ₄)	1,0
Fosfato de amônio (NH ₄ HPO ₄)	0,1
Nitrato de potássio (KNO ₃)	2,0
Cloreto de sódio (NaCl)	10,0
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	8,0

Fonte: Jourdan (2001), adaptado.

A cepa de *A. platensis* foi cultivada em meio Jourdan modificado, a partir de inóculo em tubo de ensaio, que foi transferido para um Erlenmeyer, contendo um volume do referido meio de cultura, segundo protocolo descrito de por Nogueira (2012). Em seguida, o recipiente foi disposto em uma bancada e submetido à iluminação artificial e constante, utilizando duas lâmpadas fluorescentes de 20 Watts (W) que forneciam uma iluminância de, aproximadamente, 20 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. A temperatura da sala de cultivo foi de 24° C e a agitação das células foi realizada manualmente sempre que necessário.

O volume do recipiente de cultivo foi duplicado, a cada dois dias, pela adição do meio até atingir concentração celular ideal. Em seguida, a cultura foi transferida para um frasco de maior capacidade de armazenamento, e seu volume foi novamente duplicado, diariamente, com novo meio de cultivo. A partir desse momento, a aeração da cultura passou a ser realizada com o auxílio de uma pequena bomba de diafragma. Após o desenvolvimento da cultura, foram transferidos para um *carboy* e completado com novo meio de cultivo, constituindo a cultura-mãe que seria repicada para o tratamento dos efluentes do cultivo de tilápias. Esta cultura permaneceu, durante todo o experimento no laboratório de Planctologia, sendo repicada e renovada sob iluminação e aeração constantes.

3.2 Cultivo de *A. platensis* em efluentes provenientes do cultivo de tilápia

Os experimentos deste trabalho foram realizados em um sistema de cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em ambiente externo localizado na Estação de Aquicultura do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. Alojado em ambiente ensolarado, com iluminância de 1.450 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, e consistiu de dois

módulos, cada um com uma caixa de 1.500 L e cinco caixas de 500 L interligadas por canos de PVC com 25 e 100 mm de diâmetro para permitir a recirculação da água entre estas por bombeamento.

Os alevinos revertidos sexualmente de tilápia do Nilo que fertilizaram a água, foram oriundos da própria Estação de Aquicultura e cultivados por 28 dias, em um dos módulos do sistema externo, sendo previamente aclimatados, e cultivados em água clara adicionada de 10 partes de sal de salina, ou seja, com salinidade 10. Neste caso, todas as caixas permaneceram cobertas para evitar o crescimento indesejado de outras microalgas.

As caixas de 1.500 L foram instaladas abaixo do nível das caixas de 500 L, ou seja, em aberturas escavadas na terra, a fim de realizar a drenagem da água das caixas menores por gravidade para a caixa maior através da tubulação de PVC de 100 mm de diâmetro, enquanto o retorno foi realizado por uma bomba d'água com vazão de 7.000 L h^{-1} , pelo encanamento de PVC de 25 mm de diâmetro. Cada caixa de 500 L possuía torneiras com regulagem individual.

Inicialmente transferiu-se 500 L de uma cultura previamente estabelecida da microalga, para a caixa de 1.500 L do sistema externo que já continha 1.000 L do efluente drenado de salinidade 10 gerado no cultivo de tilápia para ser também tratado pela microalga. Quando a cultura entrou em fase de crescimento exponencial, o sistema de recirculação foi ligado a fim de se realizar o tratamento do restante do efluente remanescente nas caixas menores, e assim dar início ao sistema de produção da microalga em grandes volumes (Figura 4).

Figura 4 - Sistema Integrado de cultivos de tilápia do Nilo e da microalga *Arthrospira platensis* em ambiente externo.



As caixas permaneceram abertas durante o dia para receber a insolação e, no período noturno, foram cobertas para evitar qualquer entrada de água doce proveniente de chuva. Este tratamento teve duração de 8 dias e a movimentação da água foi realizada inicialmente por aeração e, posteriormente, por uma bomba submersa com vazão de 7.000 L h⁻¹.

3.3 Acompanhamento do desenvolvimento da cultura de *A. platensis* em efluentes do cultivo de peixes

O acompanhamento do desenvolvimento das culturas de *A. platensis* foi realizado a cada dois dias (Figura 5A), pela medida da absorvância (densidade óptica – DO) de uma amostra de 25 mL da água do cultivo em um espectrofotômetro, no comprimento de onda de 680 nm. Para a obtenção da densidade celular (DC) foi utilizada a equação de regressão linear (1) obtida por Coêlho (2012) em um cultivo integrado de *A. platensis* e tilápias em condições semelhantes à realizada neste trabalho:

$$DC \text{ (Células mL}^{-1}\text{)} = [(DO_{680\text{nm}} + 0,127) / 0,179] \times 10^5 \quad (1)$$

Onde:

DC – Densidade celular (Células mL⁻¹);

DO – Densidade Óptica.

Os percentuais de remoção dos nutrientes dos efluentes gerados nos cultivos de tilápia, foram calculadas pela equação abaixo de acordo com Henry-Silva e Camargo (2008):

$$R(\%) = 100 - \left[\frac{(100 \times \text{concentração de nutriente no efluente tratado})}{\text{concentração de nutriente no efluente}} \right] \quad (2)$$

Onde:

R – Percentual de remoção de nutrientes (%).

3.4 Análises dos parâmetros de qualidade de água

Diariamente, às 09h00min, foram realizadas as análises de pH com um medidor de bancada (HANNA HI 221), oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) com auxílio de uma sonda eletrônica (YSI 55), salinidade (ppt) com refratômetro (ATAGO) e DO da água de cultivo das microalgas com espectrofotômetro (HACH DR2800).

As concentrações de N-amônia total (mg L^{-1}), N-nitrito (mg L^{-1}) e fósforo reativo (mg L^{-1}), foram determinadas no início e no final dos cultivos da microalga, seguindo metodologia apresentada no *Standard Methods* (APHA, 2005).

3.5 Extração dos polissacarídeos sulfatados de *A. platensis*

A biomassa utilizada para a extração dos polissacarídeos sulfatados de *A. platensis* foi obtida após a consolidação do sistema de cultivo externo, que passou a fornecer biomassa diariamente para a extração dos compostos.

A extração dos polissacarídeos sulfatados (PS) de *A. platensis* foi realizada a partir de um extrato quente obtido de acordo com a metodologia descrita por Tayag *et al.* (2010). Inicialmente cinco gramas de *A. platensis* em pó foram hidratadas em 300 mL de água destilada e a mistura foi fervida durante três horas. Após este período, o volume restante foi centrifugado a $7.280 \times g$ por 20 minutos e filtrado com filtro de malha de $60 \mu\text{m}$, sendo o resíduo utilizado para uma nova extração. Para a obtenção dos PS, foram adicionados quatro volumes de álcool etílico absoluto gelado (-20°C) ao extrato e a nova mistura foi deixada em repouso a 4°C por 24 h, para a precipitação dos PS. Em seguida, realizou-se uma nova centrifugação a $7.280 \times g$ por 5 min, onde o precipitado obtido foi desidratado a 60°C por 24 h em estufa com recirculação de ar.

3.5.1 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados

Uma alíquota de uma solução de PS brutos (1 mg mL^{-1}) foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, EDTA 5 mM e cisteína 5 mM, o fluxo foi mantido em 60 mL h^{-1} . Em seguida, a alíquota foi aplicada no topo do gel e a eluição da coluna feita com tampão de equilíbrio (tampão acetato de sódio) contendo concentrações crescentes de cloreto de sódio (0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 M), sendo coletadas frações de 1 mL. A presença dos PS nas frações foi verificada adicionando $200 \mu\text{L}$ das mesmas a 1 mL do corante

azul dimetildimetileno (DMB) e posterior leitura da absorvância por espectrofotometria com um comprimento de onda de 525 nm.

A concentração de carboidratos nas amostras foram avaliadas de acordo com o ensaio colorimétrico proposto por Dubois *et al.* (1956). O teste foi realizado em duplicata utilizando alíquotas das frações coletadas, as quais foram incubadas por 30 minutos com água destilada, fenol redestilado e ácido sulfúrico concentrado. Após incubação, a dosagem de carboidratos totais foi determinada a uma absorvância de 490 nm em espectrofotômetro (HACH DR2800).

3.6 Efeito da solução contendo polissacarídeos sulfatados de *A. platensis* ministrada na forma de banho de imersão aos camarões

Para a realização deste experimento foram utilizados 400 camarões juvenis da espécie *Penaeus vannamei* ($11,09 \pm 1,38$ g) adquiridos da Fazenda Aquisia Aquicultura Saraiva LTDA, localizada no município de Paraipaba-CE, a 80 km de Fortaleza. O desenho experimental está representado na Figura 3. Os juvenis foram transportados ao laboratório aquicultura em uma caixa de transporte (1.000 L) com suprimento constante de oxigênio. A duração do transporte foi de aproximadamente duas horas e, na chegada ao laboratório, os indivíduos foram aclimatados à temperatura ambiente e transferidos para um tanque de 2.000 L com aeração constante e água com salinidade 5 (a mesma praticada na fazenda). Durante dois dias, os camarões foram aclimatados para a salinidade 15, com um incremento diário de 5 partes de salinidade, e permaneceram nessas condições, durante uma semana, para a aclimação ao novo ambiente (Figura 3B).

Os indivíduos foram alimentados duas vezes ao dia *ad libitum* com ração comercial contendo 35% de proteína bruta (PB). Para manter a qualidade da água, foram realizadas trocas diárias que variaram de 30 a 75% na intenção de manter os níveis de amônia total abaixo de 1 mg L^{-1} . Os 400 juvenis de camarão foram então alocados em aquários, separados em dois grupos experimentais: (a) submetidos a diferentes concentrações de PS e (b) diferentes tempos de exposição. Inicialmente foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de PS dissolvidos em água, com o objetivo de verificar qual concentração apresentava melhor imunoestimulação, onde os camarões permaneceram imersos por três horas em cada solução. Em seguida, houve uma nova imersão dos camarões na concentração escolhida, desta vez com fracionamento do tempo de exposição.

Para a realização da primeira parte deste experimento, um primeiro lote de 200 camarões foram transferidos para aquários de 10 litros, com água contendo salinidade 15 e uma densidade populacional de 1 camarão L⁻¹, com temperatura ambiente de 27 °C. Logo após a estocagem, as diferentes concentrações de PS foram administradas diretamente na água e cada tratamento foi realizado com quatro repetições (Figura 3B).

Cada grupo experimental permaneceu em seu banho de imersão respectivo, por um período de três horas, como descrito por Tayag *et al.* (2010). Decorrido este tempo, realizou-se a retirada da hemolinfa de todos os camarões para análises dos parâmetros imunológicos. No intervalo de duas horas após a imersão dos camarões na solução com PS, foram coletadas amostras da água de cada repetição para a verificação dos parâmetros abióticos como temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) e amônia total (mg L⁻¹) como descrito no item 3.4.

Na segunda fase do experimento, para tal fim, um lote de 200 camarões foi distribuídos nos aquários, devidamente higienizados, com mesmo volume de água, salinidade, temperatura e densidade de estocagem. O objetivo desta segunda etapa foi avaliar as condições imunológicas dos camarões imersos por 3h em solução contendo 120 mg L⁻¹ de PS de *A. platensis*, cujas análises foram feitas nos tempos 0 (zero), 45, 90, 135 e 180 minutos.. Para tal, os camarões foram divididos em quatro grupos experimentais (n=15/grupo) segundo o tempo de imersão. No grupo controle, os animais foram imersos em água sem adição de PS. Ao fim de cada tempo foi realizada a retirada da hemolinfa dos camarões para análise dos imunoparâmetros, como descrito no item a seguir.

3.7 Coleta da hemolinfa e análise dos imunoparâmetros

A coleta da hemolinfa dos camarões foi realizada na própria sala do experimento (22 ± 1 °C) e as análises dos imunoparâmetros foi realizada no Laboratório de Bioquímica Marinha (BIOMAR – LAB), ambos localizados nas dependências do CEBIAQUA.

O procedimento de coleta da hemolinfa foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cantelli (2009), na região ventral do primeiro segmento abdominal higienizada com etanol 70%, de um *pool* de cinco animais por grupo experimental, utilizando uma seringa de 1 mL com agulha (13 x 0,45; 27,5 G1/2”) previamente resfriada a 4 °C. Uma parte da hemolinfa de um *pool* de 5 animais/ réplica/grupo foi imediatamente transferida para um microtubo contendo uma solução de anticoagulante Alsever modificada (MAS; 27 mM citrato de sódio; 336 mM NaCl; 115 mM glicose e 9 mM EDTA; pH 7,2), na proporção 1:2

(hemolinfa: MAS). Em seguida, a hemolinfa foi diluída em anticoagulante contendo fixador MAS-formol (4%), na proporção de 1:9 (hemolinfa:fixador) e utilizada para a contagem total de hemócitos (CTH).

A outra parte da hemolinfa sem anticoagulante, coletada dos mesmos animais acima, na forma de *pool*, foi deixada coagular, por 2 horas a 27 °C, visando a obtenção do soro para as outras análises de imunoparâmetros. A obtenção do soro foi realizada a partir de repetidas macerações do coágulo seguidas por centrifugações a 7000 x g por 10 min a 4 °C. O soro de cada grupo experimental aliquoteado e congelado, para ser utilizado posteriormente para análises das atividades da α 2-macroglobulina e da fenoloxidase (PO), bem como para a concentração de proteínas totais da hemolinfa.

3.7.1 Contagem total de hemócitos (CTH)

Para a contagem total de hemócitos (CTH), uma alíquota de 10 μ L de hemolinfa fixada foram adicionados no campo para contagem de leucócitos de uma câmara de Neubauer, (CANTELLI, 2009).

3.7.2 Atividade do inibidor de protease α 2-macroglobulina (α 2M)

A atividade da α 2M foi avaliada por meio do ensaio de proteção da protease tripsina descrito por Perazzolo *et al.* (2011). Para tal, alíquotas de 50 μ L de soro foram depositadas dentro de poços de uma microplaca (com fundo chato) e incubadas com 50 μ L de uma solução de tripsina (concentração final 5 μ g) diluída em tampão Tris/NaCl (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente (27 °C). Em seguida, foram adicionados 50 μ L de inibidor de tripsina (Sigma; concentração final 50 μ g, também diluído em Tris/NaCl) e a mistura incubada por 10 minutos a 27 °C. Após, igual volume de uma solução do peptídeo cromogênico BApNA (N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride, concentração final de 0,83 mM) foi adicionada à placa. A liberação do peptídeo cromogênico foi monitorada por espectrofotometria a 405 nm nos tempos de 0, 10, 20, 30 e 40 minutos a 27 °C. A atividade da α -2M, avaliada indiretamente através da atividade de tripsina imobilizada, foi expressa pela variação da absorbância por minuto e por mg de proteína, onde uma unidade de atividade enzimática correspondeu a um aumento de 0,001 na absorbância, por minuto e por mg de proteína. No controle negativo, o

soro dos camarões foi incubado apenas com o tampão. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

3.7.3 Atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade da enzima PO foi avaliada depositando-se 50 μL de soro diluído (15x) em tampão Tris-NaCl (50 mM de Tris, 330 mM NaCl, 5 mM de CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 , pH 7,6) (15x), de cada *pool* de animais, em poços de microplacas (fundo chato), acrescidos de 50 μL de tripsina (1mg mL^{-1}) e deixando-se incubar por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, 50 μL do substrato enzimático L-DOPA (3 mg L^{-1}) foram adicionados nas placas. A formação do pigmento vermelho-coral DOPA-cromo foi quantificada em leitor de microplacas a 490 nm, após 10 min de incubação a 20 °C. A atividade da PO foi expressa pela variação da absorbância por minuto por miligrama de proteína, onde uma unidade da atividade enzimática correspondeu ao aumento de 0,001 na absorbância, por min e por miligrama de proteína a 20 °C (SÖDERHÄLL; HÄLL, 1984). A atividade basal (PO já presente no soro) foi quantificada incubando-se a amostra com tampão Tris-NaCl ao invés de tripsina. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.7.4 Concentração de proteínas totais do soro (CP)

A concentração de proteínas totais do soro foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando como proteína padrão a albumina sérica bovina (BSA). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.7.5 Atividade antimicrobiana do soro

Para investigação da capacidade antimicrobiana do soro de cada *pool* de animais foi utilizada a metodologia adaptada de Destomieux *et al.* (1999). Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços (fundo chato), nos quais foram previamente distribuídas alíquotas de 25 μL de APA (água peptonada alcalina). Posteriormente, uma alíquota de 25 μL de cada amostra de soro foi dispensada apenas no primeiro poço (proporção de 1:2) sendo, serialmente diluída nos poços seguintes para 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64, respectivamente, em duplicata.

A atividade antimicrobiana do soro foi determinada contra a bactéria Gram-negativa *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749, gentilmente cedida pela professora Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes, do laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da UFC. As cepas padrão foram crescidas em TSA (do inglês *tryptic soy agar*) com 1% (p/v) de NaCl e incubadas a 30 °C por 24 h. Após esse período, a concentração da solução bacteriana foi ajustada em PWS (do inglês *peptone water saline*; 1,5% de peptona, 1,5% de NaCl, pH 7,2) para 10^3 UFC mL⁻¹, mensurada a 630 nm.

Após diluição do soro, depositou-se em cada poço uma alíquota de 4 µL do solução de *V. alginolyticus* a 10^3 UFC mL⁻¹. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C por 24 h. Após esse período, o crescimento bacteriano foi determinado em leitora de microplacas (DO_{630nm}) (Thermoplate – TPReader Basic), determinando-se a concentração mínima inibitória ou MIC (do inglês *minimum inhibitory concentration*) do soro diluído. A atividade antimicrobiana foi estimada como recíproco do último poço capaz de inibir o crescimento bacteriano e padronizada para a concentração de proteínas da amostra.

3.8 Análises estatísticas

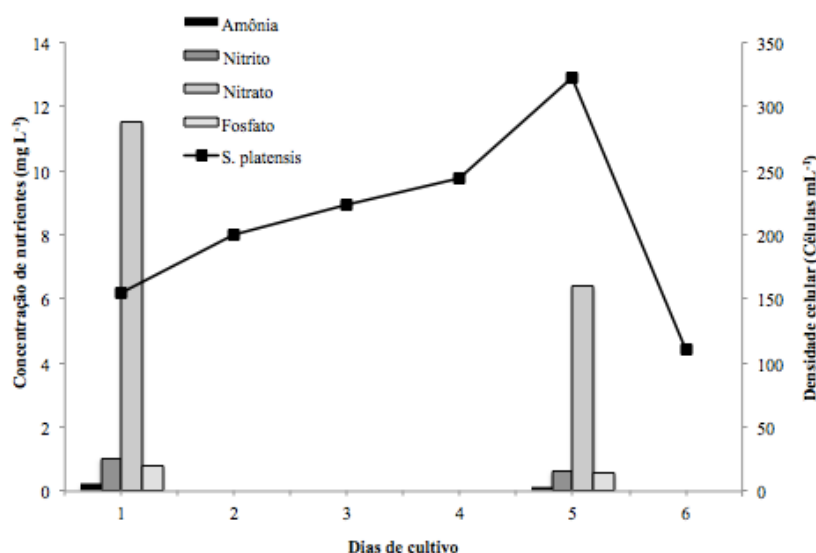
Os dados obtidos referentes aos ensaios realizados em todo o experimento foram submetidos, inicialmente, a uma análise de variância com fator único (ANOVA One-Way) e, no caso de diferenças significativas em nível de 1%, utilizou-se o teste de Tukey para comparação das médias.

4 RESULTADOS

4.1 Tratamento dos efluentes de tilápia pelo cultivo *A. platensis*

A densidade celular inicial da cultura foi de 155 mil células mL⁻¹ e a fase de indução teve uma duração de 4 dias, atingindo ao final dessa etapa, 244 mil células mL⁻¹. A partir desse momento, a cultura entrou em crescimento exponencial e atingiu 322 mil células mL⁻¹ (Figura 5).

Figura 5 – Evolução da curva de crescimento de *A. platensis* cultivada efluente de tilápia do Nilo e redução das concentrações de amônia, nitrito, nitrato e fosfato.



Fonte: Autor.

Nesta fase, o sistema de recirculação de água foi ligado a fim de tratar o restante dos efluentes remanescentes nas caixas de cultivo dos peixes.

O cultivo realizado neste experimento foi único, pela primeira vez em ambiente externo ao laboratório, mostrando-se bastante desafiador e repleto de pressões externas. O efluente utilizado não sofreu nenhum tipo de tratamento prévio, sendo observado, também, sucessivas contaminações por rotíferos (*Brachionus plicatilis*), o que impossibilitou a verificação completa do consumo de nutrientes em relação a taxa de crescimento algal e acelerou o processo de recirculação de sistema na tentativa de tentar conter as contaminações.

A redução dos nutrientes, ocorreu de forma rápida e eficaz durante o período de desenvolvimento da *A. platensis* no efluente, em especial para os nitratos que foram reduzidos em 44,3% com 6 dias de cultivo. As concentrações de nitritos e fosfatos foram reduzidas em

39,6 e 28,6%, respectivamente, após os 6 dias de cultivo, enquanto que a concentração de amônia ficou praticamente constante.

No presente trabalho, ficou evidente que a taxa de crescimento da *A. platensis* estava fortemente relacionada com a concentração dos nutrientes, e que esta alcançou um crescimento satisfatório, sendo assim, possível estabelecer uma cultura em larga escala de *A. platensis*.

A partir do momento que houve o controle dos rotíferos, o sistema de cultivo passou a ser do tipo semi-contínuo com a remoção periódica da biomassa de *A. platensis* e adição de efluente de tilápias cultivadas em um tanque de água doce e ao abrigo de luz, para compensar as perdas com a evaporação e suplementar o consumo de nutrientes. O controle da cultura passou a ser realizado por observação da densidade óptica ($DO_{680\text{ nm}}$), sempre que este valor atingia uma marca superior a 0,600, foi realizada a remoção da biomassa excessiva da microalga, realizada através de filtração em malha de 60 μm . A biomassa úmida era retirada da malha e seca em estufa com recirculação de ar, por 24 horas.

Dessa forma, a cultura de *A. platensis* vem sendo mantida na Estação de Aquicultura por um período de aproximadamente 3 anos, graças à adição constante de efluentes de tilápias cultivadas em água doce. Assim, o aumento da salinidade com a evaporação é constantemente revertido pela adição do mesmo volume evaporado. Vale salientar que não seria possível manter esse tipo de cultivo com a adição de fertilizantes e água salobra devido ao alto custo. A cultura permanece até a atualidade, fornecendo periodicamente biomassa, para a realização das etapas seguintes deste trabalho, como para a realização de diversas atividades no âmbito do grupo de pesquisa.

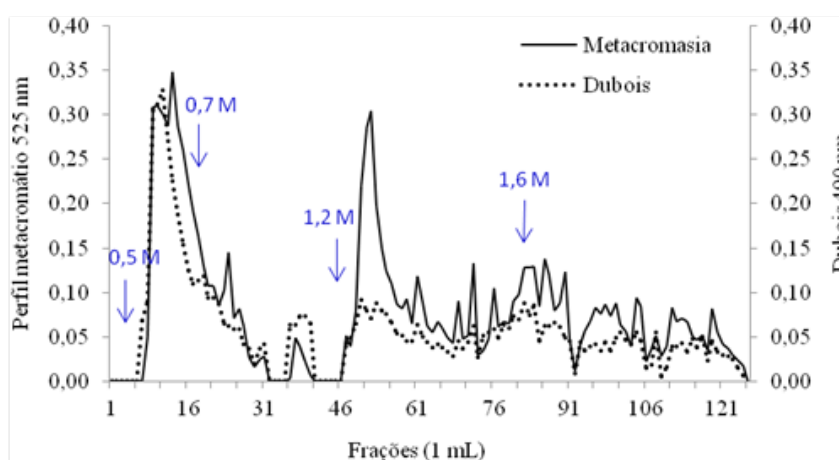
4.2 Extração e fracionamento dos polissacarídeos sulfatados de *A. platensis*

Foram utilizados um total de 230 g da biomassa seca de *A. platensis* para a extração de 19,85 g de PS, correspondendo a um rendimento de aproximadamente 8,6%. A concentração total de açúcar no extrato bruto foi de 86%, mostrando que a extração a quente seguida de precipitação alcoólica foi bastante eficiente na remoção dos polissacarídeos de *A. platensis*.

Na cromatografia em DEAE-celulose dos PS extraídos de *A. platensis* foram obtidas duas frações principais com elevada metacromasia, sendo a maior eluída com 0,5 M de NaCl e a menor eluída com 1,2 M do sal. Por outro lado, o teste de Dubois revelou uma elevada presença de açúcar apenas na maior fração (0,5 M), enquanto a menor fração (1,2 M)

apresentou um baixo teor glicídico (Figura 6). Este perfil mostrou uma menor relação metacromasia/açúcar total na segunda fração, o que sugere a presença de polissacarídeos com mais grupamentos sulfato por unidade de açúcar. Já essa relação na primeira fração foi bem semelhante, sugerindo um polímero com unidades de açúcar pouco sulfatadas e/ou algumas unidades sem sulfatação o que resultou em uma carga total negativa menor.

Figura 6 – Cromatografia em DEAE-celulose dos polissacarídeos sulfatados extraídos da biomassa seca de *Arthrospira platensis*.



Fonte: Autor.

4.3 Administração do PS de *A. platensis* a juvenis de *P. vannamei*

Os resultados da primeira fase de teste de concentração de PS mostrou que a melhor delas foi a de 120 mg L^{-1} , utilizada na segunda fase para reduzir os tempos de exposição.

A dissolução dos PS na água de cultivo do primeiro lote de camarões resultou na presença de uma espuma bastante intensa, principalmente nos tratamentos com as maiores concentrações do composto. No entanto, esse fato não afetou os animais e não foi verificada nenhuma mortalidade durante todo o experimento. Além disso, os parâmetros da qualidade de água (OD, temperatura e amônia total), avaliados duas horas após o início da administração dos PS, ficaram dentro dos níveis desejados (Tabela 2) para o cultivo de camarões marinhos (BARBIERI; OSTRENSKY, 2002) e não interferiram nos resultados obtidos.

Tabela 2 – Parâmetros da qualidade da água, duas horas após a administração do PS de *A. platensis* na água de cultivo dos camarões.

Tratamentos (mg L ⁻¹)	OD (mg L ⁻¹)	T (°C)	Amônia (mg L ⁻¹)
0,0	6,0 ± 0,6	23,7 ± 1,7	0,8 ± 0,2
60,0	5,7 ± 0,4	24,1 ± 0,5	0,5 ± 0,1
120,0	6,1 ± 1,0	25,1 ± 1,4	1,0 ± 0,1
240,0	5,5 ± 0,4	23,7 ± 0,6	0,7 ± 0,1

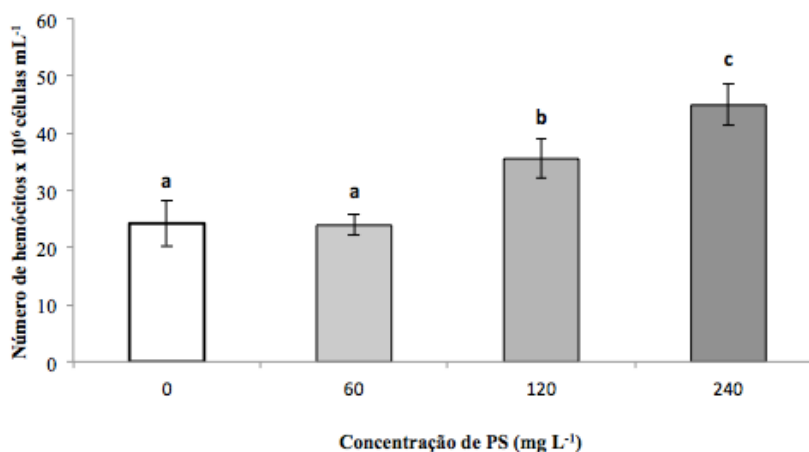
Fonte: Autor.

4.4 Avaliação das condições de saúde de juvenis de *P. vannamei*

Após três horas de imersão na solução contendo as diferentes concentrações de PS de *A. platensis*, os imunoparâmetros apresentaram um aumento gradativo à medida que se elevava a concentração dos PS.

Na contagem total de hemócitos (CTH) não foi verificada alteração nos animais imersos em água contendo a concentração de 60 mg L⁻¹ de PS, em relação ao tratamento controle, com valores de $23,9 \pm 1,7$ e $24,2 \pm 3,9 \times 10^6$ células mL⁻¹, respectivamente (Figura 7). Nas maiores concentrações (120 e 240 mg L⁻¹ de PS) de PS na água de imersão, os animais apresentaram uma maior CTH ($35,5 \pm 3,4$ e $44,5 \pm 3,6 \times 10^6$ células mL⁻¹), sugerindo uma maior produção de hemócitos, possivelmente porque os PS são substâncias estranhas ao organismo dos animais e assim, a maior oferta destes parece ter influenciado diretamente na circulação de células para aumentar o combate a um “possível” agente invasor e migração para áreas de contato com o agente externo (PS).

Figura 7 – Contagem total de hemócitos (CTH) em juvenis de camarões marinhos *P. vannamei*, três horas após banho de imersão com diferentes concentrações de PS de *A. platensis*.



Em relação à concentração de proteínas totais da hemolinfa (soro), os animais submetidos à exposição aos PS de *A. platensis* apresentaram um aumento significativo neste parâmetro em relação ao tratamento sem adição de PS, independente da concentração utilizada (Tabela 3), não havendo contudo diferença entre os tratamentos com 120 ou 240 mg/L de PS. A CP mais baixa foi verificada no grupo controle ($84,80 \pm 0,57$ mg L⁻¹ de P) e o valor mais elevado de CP foi observado na concentração mais baixa de PS ($105,15 \pm 7,28$ mg L⁻¹ de P).

Tabela 3 – Parâmetros imunológicos de juvenis *P. vannamei* três horas após a imersão em água contendo PS extraídos de *A. platensis*.

Concentração de PS (mg L ⁻¹)	Parâmetros Imunológicos		
	CP ¹ (mg L ⁻¹)	PO ² (U. min ⁻¹ mg ⁻¹ de P)	α2-M ³ (U. min ⁻¹ mg ⁻¹ de P)
0	$84,80 \pm 0,57^c$	$117,22 \pm 2,80^a$	$1,68 \pm 0,16^d$
60	$105,15 \pm 7,28^a$	$79,97 \pm 4,09^c$	$5,04 \pm 0,07^a$
120	$94,80 \pm 1,13^b$	$109,18 \pm 7,81^{ab}$	$2,39 \pm 0,01^c$
240	$93,40 \pm 4,10^b$	$95,65 \pm 7,22^b$	$3,15 \pm 0,06^b$

¹Concentração de proteínas totais da hemolinfa; ²Atividade da enzima fenoloxidase (PO); ³Atividade do inibidor de proteases α 2-macroglobulina. Letras diferentes representam as diferenças estatísticas. Fonte: Autor.

No presente estudo, a redução da atividade da PO nos camarões expostos à menor concentração de PS, ou seja, 60 mg L⁻¹ (Tabela 3) pode ter sido reflexo do menor número de hemócitos circulantes encontrado nos animais deste tratamento (Figura 7) e/ou uma redução na produção celular pelo tecido hematopoiético, já que os hemócitos ali produzidos armazenam as moléculas precursoras do sistema PO, entre outras moléculas imuno-efetoras (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

A exposição dos camarões aos PS de *A. platensis* na água pode ter induzido algumas respostas imunes de forma semelhante à exposição a um patógeno, servindo assim de imunoestimulante. No entanto, esse efeito não foi tão potente e variou com a concentração de PS utilizada, com menor atividade da PO na menor concentração testada (60 mg L⁻¹) e a partir da concentração de 120 mg L⁻¹ os valores forem semelhantes ao basais dos animais controle. Estudos posteriores poderiam incluir análises moleculares para avaliar a expressão de alguns genes imunes para se obter maiores informações a respeito do potencial efeito imunoestimulante dos PS de *A. platensis*.

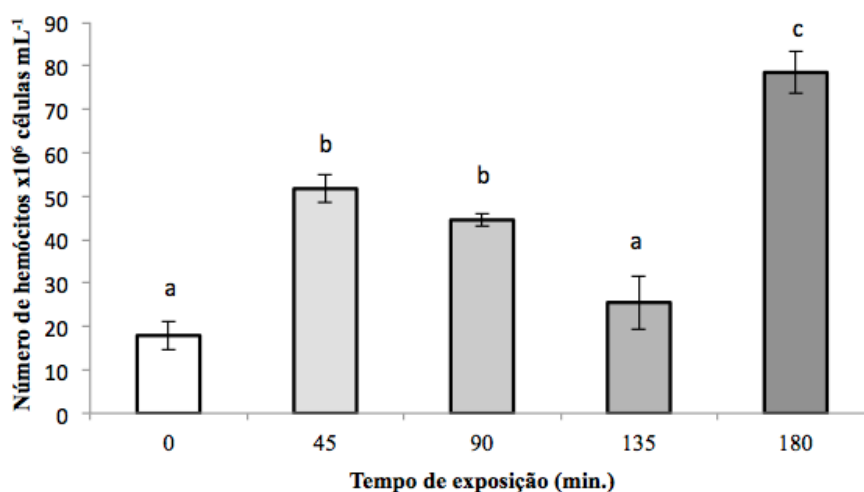
4.4.1 Avaliação dos imunoparâmetros de *P. vannamei* em diferentes tempos da exposição dos camarões em solução contendo PS de *A. platensis*

Com o encerramento da primeira parte do experimento e análises dos parâmetros imunológicos iniciais, verificou-se que animais em banhos de imersão com PS de *A. platensis* a uma concentração de 120 mg L^{-1} apresentaram a melhor imunoestimulação (Vide Resultados, item 4.4.1).

Uma vez escolhida a melhor concentração (120 mg L^{-1}) de PS, observou-se o efeito da exposição dos animais a estes polissacarídeos ao longo do tempo, para tal, uma mesma quantidade de camarões foi exposta a essa concentração de PS por um igual período de 3 horas (180 minutos) e nos tempos de 0, 45, 90 e 135 minutos.

Ao longo da redução do tempo inicialmente testado (3h) de exposição dos camarões em água contendo 120 mg L^{-1} de PS, verificou-se que os valores de CTH variaram (Figura 8). Logo nos primeiros 45 minutos de exposição houve uma elevação no número de hemócitos circulantes ($51,7 \pm 3,15 \times 10^6 \text{ células mL}^{-1}$) em relação ao tempo 0 ($17,9 \pm 3,32 \times 10^6 \text{ células mL}^{-1}$). O maior aumento de CTH ocorreu quando os animais permaneceram mais tempo expostos aos PS (180 minutos), sendo verificado $78,5 \pm 4,77 \times 10^6 \text{ células mL}^{-1}$ no referido tempo (Figura 8).

Figura 8 - Contagem total de hemócitos (CTH) em juvenis de camarões marinhos *P. vannamei* após banho de imersão de PS de *A. platensis* na concentração de 120 mg L^{-1} .



Quanto à concentração de proteínas na hemolinfa dos camarões, foi possível notar que após 90 minutos de exposição há uma redução de proteínas totais na hemolinfa dos animais ($96,89 \pm 7,45 \text{ U. min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de P), seguido de um aumento gradativo dos valores, observado com 135 minutos ($102,03 \pm 2,10$ caracterizando uma tentativa de retorno aos níveis basais (Tabela 4), uma vez que em 180 minutos ($131,55 \pm 15,26 \text{ U. min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de P), os

valores não diferem em relação ao tempo zero e 45 minutos ($121,24 \pm 7,00$ e $128,72 \pm 9,84$ U. $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de P, respectivamente).

Tabela 4 – Parâmetros imunológicos de juvenis de camarão *P. vannamei* em diferentes tempos de imersão em solução contendo 120 mg L^{-1} de PS de *A. platensis*.

Tempo de exposição (min)	Parâmetros Imunológicos		
	CP ¹ (mg. L ⁻¹)	PO ² (U.min. ⁻¹ mg ⁻¹)	α2M ³ (U.min. ⁻¹ mg ⁻¹)
0	$121,24 \pm 7,00^a$	$45,16 \pm 4,72^c$	$1,61 \pm 0,12^b$
45	$128,72 \pm 9,84^a$	$41,95 \pm 6,07^c$	$1,86 \pm 0,35^b$
90	$96,89 \pm 7,45^b$	$65,33 \pm 6,17^a$	$1,78 \pm 0,13^b$
135	$102,03 \pm 2,10^b$	$72,33 \pm 2,80^a$	$3,68 \pm 0,51^a$
180	$131,55 \pm 1,62^a$	$55,87 \pm 2,40^b$	$2,00 \pm 0,34^b$

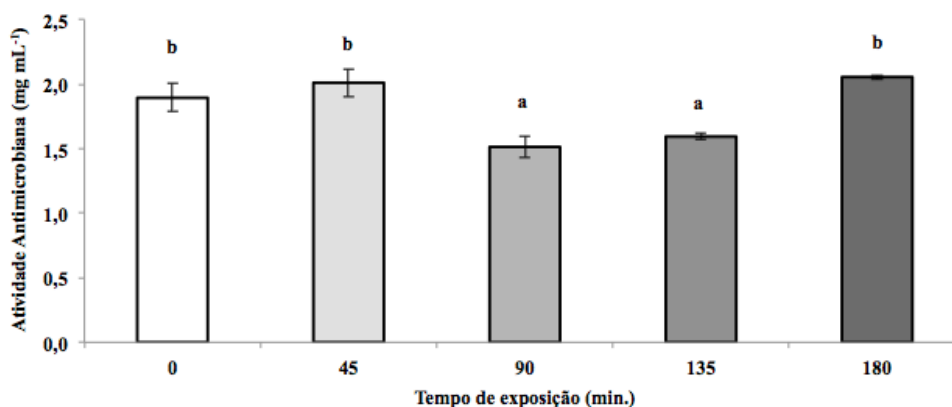
¹Concentração de proteínas; ²Atividade da enzima fenoxidase; ³Atividade da enzima α2macroglobulina. Letras diferentes representam as diferenças estatísticas. Fonte: Autor.

Com isso, foram observados que as maiores concentração de PO, que ocorreram entre os minutos 90 e 135, diferindo dos demais tratamentos. Com 180 minutos, verificou-se uma tentativa do organismo dos camarões em retornar aos níveis normais a concentração de PO, porém este ainda se encontrava um pouco acima dos valores do tratamento zero minuto.

A exposição dos camarões aos PS de *Arthrospira platensis* prolongada até 135 minutos, apresenta o maior valor observado da α2-M ($3,68 \pm 0,51$ U. $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de P) em relação a todos os demais tratamentos (Tabela 4). Com 45, 90 e 180 minutos foram obtidos valores semelhantes aos observados no tempo zero ($1,61 \pm 0,12$; $1,86 \pm 0,35$; $2,00 \pm 0,34$ U. $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente).

A atividade antimicrobiana do soro retirado dos camarões nos diferentes tempos, foi observada através da capacidade de inibir o desenvolvimento de *V. alginolyticus*, assim, foi possível observar que há uma maior necessidade de recrutamento de proteínas para combater infecções nos tempos zero, 45 e 180 minutos, devido a menor circulação de PO nestes momentos (Figura 9). Já nos tempos 90 e 135 minutos, há uma menor necessidade por proteínas ($1,51$ e $1,59 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente) em relação aos demais tratamentos, isto mostra que a hemolinfa dos animais nestes tempos se torna mais capaz de combater a uma possível infecção ao *V. alginolyticus*.

Figura 9 - Atividade antimicrobiana do soro dos camarões *P. vannamei* contra *V. alginolyticus*, nos diferentes tempos de imersão em solução contendo 120 mg L⁻¹ de PS de *A. platensis*.



5 DISCUSSÃO

5.1 Tratamento dos efluentes de tilápia pelo cultivo *A. platensis*

Cultivando *A. platensis*, sob condições iluminação artificial e em efluentes de cultivo de tilápia do Nilo, Coêlho (2012) obteve uma densidade celular máxima de aproximadamente de 6 milhões de células mL⁻¹, número este bem superior ao encontrado neste experimento, entretanto, o ambiente de cultivo foi isolado e mais propício ao desenvolvimento da cultura, com um mínimo de interferência externa.

Para um bom desenvolvimento das culturas, Lourenço (2006) recomenda que estas sejam mantidas livres de quaisquer agentes contaminantes e predadores, uma vez que interferem diretamente no crescimento celular e/ou competem por espaço, luz e nutrientes.

Devido a capacidade de tolerar um pH elevado, Markou e Georgakakis (2011), sugerem a manutenção da cultura de *A. platensis* em pH elevados, evitando assim a presença de agentes contaminantes. Assim, para permanência das culturas e continuidade dos trabalhos, foi adicionado, bicarbonato de sódio no sistema, este por sua vez propiciou a elevação do pH do ambiente de cultivo, fato este que favoreceu ao desenvolvimento da microalga e eliminou os rotíferos.

Na aquicultura, o nitrogênio e o fósforo são os principais resíduos gerados capazes de provocar a eutrofização de corpos hídricos. Algumas medidas para remediar a ação destes compostos são o uso de bacias de sedimentação, biofiltro e o tratamento por organismos fitoplanctônicos, como medida para atenuar os impactos ambientais causados pela descarga de efluentes (CYRINO *et al.*, 2010)

Segundo Markou e Georgakakis (2011), as microalgas desenvolvem-se aproveitando a energia solar e grandes quantidades de fertilizantes, e o uso de efluentes ricos em compostos inorgânicos, como nitrogênio e fósforo, constituem uma boa alternativa para a produção em grande escala. De acordo com Coêlho (2012), a microalga *A. platensis* quando cultivada em condições ideais, foi capaz de remover 95,57% e 87,9% da amônia e do nitrato presentes em efluentes de tilapicultura, respectivamente.

Derner *et al.* (2006) afirmam que as microalgas possuem um melhor crescimento em presença de amônia. Kumar, Miao e Wyatt (2010) mostraram que a microalga *Chlorella vulgaris* removeu mais de 85% de amônia total quando cultivada em efluentes de suinocultura. Já Bertoldi *et al.* (2007) avaliaram o consumo de nitrato pela microalga *C. vulgaris* em diferentes soluções hidropônicas, constaram taxa de remoção entre 87 e 80,4% de nitrato.

Deve-se atentar para o tipo de organismos fitoplanctônico a ser utilizado nessa produção, pois cultivos tradicionais, em águas verdes, sem a identificação da espécie cultivada, a remoção da biomassa é quase impossível, sendo necessário como forma de controle a renovação superficial da camada de água (CHUNTAPA; POWTONGSOOK; MENASVETA, 2003). No entanto, a *A. platensis* pode ser controlada através de uma simples remoção por filtração, devido a sua formação em colônias de tricomas, formando filamentos de maiores dimensões em relação as unidades celulares (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Para este fim, é necessário apenas o uso de malhas com abertura de 60 μ m.

5.2 Extração e fracionamento dos polissacarídeos sulfatados de *A. platensis*

Segundo Tayag *et al.* (2010), o percentual de açúcar obtido de *A. platensis* pelo método do extrato quente aquoso, sem a precipitação alcoólica, foi de 15,8%, valor bem inferior ao encontrado neste trabalho. Dessa forma, a modificação da metodologia de extração, através da adição de etanol absoluto gelado ao extrato aquoso para a precipitação dos PS, resultou em um aumento bastante significativo no teor de açúcar total do extrato bruto. Aubrey (2006) relata que o extrato quente aquoso de *A. platensis* possui polissacarídeos compostos, principalmente, por ramnose, frutose, galactose e glicose, semelhante ao obtido por Tayag *et al.* (2010) que observaram um polímero rico em ramnose e frutose, utilizando a mesma metodologia de extração da autora.

5.3 Avaliação de alguns imunoparâmetros em juvenis de *P. vannamei* imersos em água contendo polissacarídeos sulfatados de *A. platensis*

O uso de substâncias potencialmente imunoestimulantes na ração de camarões ou ministrado como banho de imersão pode ser uma boa ferramenta para melhorar o funcionamento do sistema imunológico de camarões. A correta utilização da relação dose/resposta melhora o desempenho zootécnico, bem como a resistência a patógenos como vírus, fungos e bactérias. Além disso, a existência de uma grande variedade de compostos imunomoduladores, obtidos das mais variadas fontes, e a disparidade dos resultados devida à grande variação dos valores basais dos imunoparâmetros (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014), reforçam a necessidade de uma constante investigação da ação desses compostos nos diferentes estágios de vida dos camarões marinhos.

A utilização de parâmetros hematológicos e bioquímicos para a avaliação do estado de saúde de organismos são ferramentas comumente empregadas dentro da medicina humana e veterinária. Na carcinicultura, as ferramentas indicadoras de saúde são os parâmetros hemato-imunológicos, dentre eles os mais empregados são: hemograma, atividade da enzima PO, atividade do inibidor de proteases α 2-macroglobulina, índice fagocítico, produção de ROI's (espécies reativas de oxigênio, do inglês, *reactive oxygen intermediates*) e capacidade hemaglutinante da hemolinfa (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). No entanto, existe uma dificuldade em se estabelecer valores de referência desses parâmetros devido à grande variabilidade encontrada nos animais, mesmo se tratando de uma mesma população, sexo e estágio de desenvolvimento.

Recentemente, o uso de um extrato de *A. platensis* via banho de imersão em camarões *P. vannamei* apresentou uma atividade imunoestimulante, resultando em um aumento na resistência contra o *V. alginolitycus* (TAYAG *et al.*, 2010).

De forma geral, o número total de hemócitos circulantes pode ser considerado uma ferramenta importante para avaliar as condições gerais de saúde e estado imunológico dos crustáceos (SMITH; BROWN; HAUTON, 2003).

Segundo Tayag *et al.* (2010), a utilização de um extrato obtido de *A. platensis* em camarões é uma forma de estimular o sistema imunológico de camarões. Os autores mostraram que os animais submetidos a uma concentração de 400 mg L⁻¹ do extrato, via banho de imersão, apresentaram um aumento de 55% na CTH, após três horas de exposição. Chang *et al.* (2012), observaram que após a administração de diferentes concentrações de zingerona, um composto derivado do gengibre (*Zingiber officinale*) na dieta de camarões *P.*

vannamei, não sendo possível constatar diferença significativa na quantidade de hemócitos circulantes entre os tratamentos, mesmo, o composto apresentando influência direta em outros parâmetros hematológicos.

Quando alimentados com ração comercial adicionada de 0,6% de biomassa seca de *A. platensis*, camarões *P. vannamei* apresentaram valores similares ao deste experimento em número de hemócitos circulantes, $35,7 \pm 5,5 \times 10^6$ células mL⁻¹ (MILANEZ, 2014). Rodrigues (2012) ao adicionar 0,5% de PS de *A. platensis* na dieta de camarões *P. vannamei*, ao final de 14 dias de alimentação, observou um aumento de 28% no número de hemócitos circulantes ($39,3 \pm 3,5 \times 10^6$ células mL⁻¹) em relação ao tratamento sem os PS, os valores estes, também aproximados ao observado neste trabalho na concentração de 120 mg L⁻¹ de PS de *A. platensis* dissolvidos na água.

Quando da imersão de camarões *P. vannamei* em solução contendo diferentes concentrações de carragenana purificada (0, 200, 400 e 600 mg L⁻¹), Chen *et al.* (2014) observaram a influência deste composto no aumento do número de hemócitos circulantes após três horas de exposição. Entretanto, ao longo do experimento, os autores observaram também, que esse aumento ocorre de forma gradativa, com 1 hora de exposição e que após 5 horas, devido ao potencial não letal da substância, esses valores tendem a reduzir.

Ozório (2013), ao adicionar 1% de PS da microalga rodofícea *Porphyridium cruentum* à dieta de camarões, observou $36,9 \pm 3,6 \times 10^6$ células mL⁻¹ de hemócitos circulantes. Já Cantelli (2009), encontrou valores pouco abaixo dos citados anteriormente, quando adicionou os PS da macroalga rodofícea *Gracilaria birdiae* na dieta de camarões, já Fu *et al.* (2007), encontraram um aumento de, aproximadamente, 23% na CTH de camarões alimentados com extrato de *Gelidium amansii* adicionada à dieta destes animais.

Os resultados da CTH após a administração do extrato da macroalga *G. amansii*, via banho de imersão, resultou em um aumento significativo no número de hemócitos dos camarões expostos as concentrações de 400 e 600 mg L⁻¹ do extrato na água, semelhante aos resultados encontrados por Lin *et al.* (2010) e Yeh *et al.* (2010).

A ação imunoestimulante desses compostos sobre os hemogramas de camarões é muito controversa e de difícil comparação, devido às diferentes metodologias aplicadas, bem como, as substâncias utilizadas.

Yeh *et al.* (2010) submeteram *P. vannamei* a um banho de imersão com o extrato obtido da macroalga marinha vermelha *Gracilaria tenuistipitata* após um estresse salino. Os autores observaram que os animais expostos à concentração de 600 mg L⁻¹ do extrato da

macroalga apresentaram uma maior capacidade de manter estável o número de hemócitos circulantes, mesmo seis horas após o estresse.

Yeh; Lee e Chen (2006) também avaliaram os imunoparâmetros de *P. vannamei* desafiados com o *Vibrio alginolyticus*, após a administração do extrato obtido da macroalga marinha parda *Sargassum duplicatum*, por meio do banho de imersão, injeção e oral. Os autores concluíram que, em todos os tratamentos, o número de hemócitos circulantes aumentou significativamente com aumento da concentração do extrato na água, independente da forma de administração.

A determinação do hemograma em crustáceos é uma ferramenta importante na avaliação do estado de saúde destes animais. Essa técnica reflete usualmente a presença de alterações fisiológicas como, por exemplo, a ecdise, idade e sexo, além de alterações de origem ambiental, tais como a variação de salinidade, temperatura e hipóxia (CUÉLLAR-ANJEL, 2014).

O primeiro passo para desencadear qualquer reação imunológica é o reconhecimento da presença de um corpo estranho ao do hospedeiro. Assim, os invertebrados como o camarão, conduzem a ativação de diferentes respostas imunológicas a fim de controlar e eliminar as infecções (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014).

Nas proteínas plasmáticas cerca de 90 a 95% destas, corresponde ao pigmento respiratório hemocianina, o restante cerca de 5 a 10%, compreendem, entre outras, as proteínas imunológicas (PERAZZOLO *et al.*, 2011).

Cantelli (2009) observou que a concentração de proteínas totais não variou entre os animais tratados ou não com o PS da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* e desafiados ou não com o vírus da mancha branca (WSSV). Porém a CP apresentou um ligeiro aumento para os camarões não tratados com PS e desafiados com o vírus para o terceiro dia após a infecção ($63,56 \pm 9,42 \text{ mg L}^{-1}$). De forma semelhante ao 14º dia após a infecção a CP ($80,6 \pm 17,20 \text{ mg L}^{-1}$) se mostrou maior para esse mesmo tratamento, no entanto, inferiores aos valores obtidos no presente estudo. Costa (2008) cita valores mais altos, variando de 105,5 a 141 mg L^{-1} , para animais desafiados com o IMNV.

A melanização é causada pela ativação do sistema profenoloxidase, trata-se de um potente mecanismo de defesa do sistema imune inato, possui um papel fundamental na eliminação de patógenos (CERENIUS; SODERHALL, 2004; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014; SANGSURIYA *et al.*, 2016).

O papel imunológico do sistema proPO é gerar transitoriamente moléculas altamente tóxicas, que levam a destruição dos patógenos e invasores, mas que também podem danificar o tecido do hospedeiro (CERENIUS; SODERHALL, 2004).

A atividade da enzima PO é um imunoparâmetro comumente utilizado para avaliar o estado de saúde de camarões (RODRÍGUEZ; LE MOULLAC, 2000). Quando o organismo é infectado por patógenos, esses corpos estranhos se ligam diretamente aos hemócitos granulares ou através de proteínas de reconhecimento padrão (PRPs) plasmáticas que medeiam a ligação aos hemócitos e, estes, induzem a uma degranulação ou exocitose regulada para liberar várias moléculas efetoras, entre elas as do sistema proPO (BARRACCO, PERAZZOLO; ROSA, 2014).

O uso do extrato da planta *Gynura bicolor*, adicionado na dieta do camarão *P. vannamei* por 28 dias, mostrou um aumento gradativo da produção da enzima PO ao longo dos dias, muito influenciado pelo aumento do número de hemócitos circulantes (WU *et al.*, 2015).

Lin *et al.* (2010) verificaram que os valores da atividade da enzima fenoxidase nos camarões *P. vannamei* aumentou proporcionalmente com a elevação da concentração do extrato de *A. platensis* na água.

Tayag *et al.* (2010) avaliaram a administração do extrato de *A. platensis* via banho de imersão e injeção em camarões marinhos *P. vannamei* desafiados com *V. alginolyticus* e verificaram que houve um aumento significativo na atividade da PO, independente da forma de administração, nas concentrações mais altas do extrato, principalmente no caso do banho de imersão.

A ativação do sistema proPO deve ser regulada na intenção de evitar uma ativação indesejada ou generalizada, que pode causar grandes danos ao próprio hospedeiro, como reações citotóxicas e deletérias em células do hospedeiro. Para isso os animais possuem uma série de moléculas que contribuem para uma regulação negativa de reações de melanização e os inibidores de serino-preoteases (SPIs), tais como a pacifastina e a $\alpha 2$ -macroglobulina (CERENIUS; LEE; SODERHÄLL, 2008; SANGSURIYA *et al.*, 2016). Esses inibidores da família das α -macroglobulinas também são capazes de inibir proteases exógenas produzidas pelo patógeno durante o processo infeccioso (ARMSTRONG, 2006).

A $\alpha 2$ -macroglobulina é um inibidor de proteases bastante importante para o sistema imunológico dos animais, por atuar em amplo espectro, e por inibir tanto as proteases do próprio hospedeiro como as produzidas por agentes patogênicos durante um processo

infeccioso, além de ter sua produção constante no interior das células dos camarões (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SODERHALL, 2006; AMPARYUP; CHAROENSAPSRI; TASSANAKAJON, 2013).

Estudos que analisaram a expressão gênica da α 2-M mostraram que a sua expressão foi aumentada 48 h após o desafio com vírus (TONGANUNT *et al.*, 2005) ou após o tratamento dos animais com LPS e PGs bacterianos (VASEEHARAN *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2008).

A administração de imunostimulantes herbais é segura, ambientalmente correta, e significa uma alternativa para o combate de enfermidades pelas indústrias na aquicultura (WU *et al.*, 2015). Estudos prévios, mostraram que dietas contendo extratos das algas vermelhas *G. amansii*, *G. tenuispitata* e zingerona foram capaz de aumentar a imunidade de *P. vannamei* frente a desafios com vibrio (CHANG *et al.*, 2012; FU *et al.*, 2007; HOU; CHEN, 2005).

Cerenius *et al.* (2010), observaram que o soro do lagostim *Pacifastacus leniusculus* exibiu um forte efeito antibacteriano *in vitro* contra as bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae*. O extrato da macroalga *G. tenuispitata*, vem sendo estudado como um potencial de promover o aumento da imunidade em camarões *P. vannamei*, bem como, no combatente a infecções provocadas por *V. alginolyticus* (HOU; CHEN, 2005; YEH; CHEN, 2009).

Lin *et al.* (2011) verificaram que este mesmo extrato, também possui um efeito sobre infecções virais, onde camarões *P. vannamei* imersos em solução contendo 600 mg L⁻¹ do extrato de *G. tenuispitata*, além de apresentarem ativação de seus sistemas imunológicos, foram capaz de resistir a infecções provocadas pelo WSSV. Os autores salientam que muito desse efeito se deve aos polissacarídeos presentes no extrato, que podem favorecer a resistência dos animais, porém, com a característica de ser dose dependente.

Huynh *et al.* (2011) observou que o extrato da macroalga *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense*, é rico em polissacarídeos contendo grandes proporções de fucose e polissacarídeos sulfatados, e que estes quando na concentração de 300 mg L⁻¹ foram capaz de promover maior resistência aos camarões testados, quando desafiados contra WSSV.

Parâmetros ambientais também tendem a conduzir a imunomodulação dos mecanismos de defesa de camarões. Lin *et al.* (2012) testaram a variação de salinidade (2,5 a 35 ppt de salinidade), frente aos parâmetros imunológicos do camarão *P. vannamei* e contra infecções por *V. alginolyticus* e WSSV. Os autores observaram que a medida que a salinidade tende a decrescer os parâmetros como número total de hemócitos e a PO, e a resistência a

agentes patogênicos como *V. alginolyticus* e WSSV, também tendem a diminuir, prejudicando os mecanismos de defesa do animal. As perturbações ambientais como a redução da salinidade, ou uma possível infecção, geram um gasto energético excessivo no sistema imunológico dos animais na tentativa de controlar as reações que se sucedem (LIN *et al.*, 2012).

6 CONCLUSÃO

Pode-se observar durante o cultivo da microalga *Arthrospira platensis*, em efluente dos cultivos de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), que esta mostrou-se extremamente adaptável ao cultivo externo, sendo possível manter a cultura, além de consumir de forma bastante eficiente os nutrientes dissolvidos no efluente. Apresentou ainda uma excelente produção de biomassa, possibilitando um alto rendimento de PS.

A introdução da precipitação alcoólica à metodologia, incrementou significativamente o percentual de açúcar no extrato da microalga, sendo possível em seguida, realizar o fracionamento dos PS, com duas frações principais com alta atividade metacromática e diferentes teores de açúcar.

A exposição dos camarões, *Penaeus vannamei* aos PS de *Arthrospira platensis*, mostrou que a concentração de 120 mg L⁻¹ foi a mais indicada para uso como imunostimulantes, pois além de elevar os níveis de hemócitos circulantes, manteve a atividade basal do sistema PO, sem ter a necessidade de regulação pela α 2-M.

Esta imunostimulação foi comprovada ao longo do tempo de exposição, sendo verificado a existência de variação dos parâmetros hematológicos, mostrando o tempo de maior circulação das moléculas imunofetoras, sendo esta comprovada com um combate mais efetivo da *V. alginolyticus*, nos tempos de 90 e 135 minutos.

A presença dos PS da microalga *Arthrospira platensis* dissolvidos na água de cultivo de camarões marinhos *Penaeus vannamei*, mostrou a capacidade destes compostos em potencialmente induzir a uma imunostimulação, tornando benéfica sua presença aos camarões, entretanto, a forma de administração deve ser avaliada como via de implementar este composto em cultivos comerciais de camarão.

REFERÊNCIAS

- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidante defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 138, p. 405-415, 2004.
- 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.
- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 109-117, 2008.
- AMPARYUP, P.; CHAROENSAPSRI, W.; TASSANAKAJON, A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune response against major pathogens. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, p. 990-1001, 2013.
- ANDREWS, S. R.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; MUKHERJEE, S. C.; KUMAR, S. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeorohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonashydrophila* challenge, **Research in Veterinary Science**, Oxon, v. 91, n. 1, p. 103-109, 2011.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20 ed. Washington. 2000.
- ARAD, S.; LEVY-ONTMAN, O. Red microalgal cell-wallpolysaccharides: biotechnological aspects. **CurrentOpinion in Biotechnology**, v.21, p.358-364, 2010.
- ARMSTRONG, P. B. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 263-281, 2006.
- ARAUJO, G.S. **Efeito imunoestimulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* na reversão sexual de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1766) em condições adversas**. 2006. 57f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- AUBREY, S. M. **Spirulina: answer for the hungry**. 2006. Disponível em: <<http://www.familyhealthnews.com/alternative-health-information/natural-plants-bacteria/spirulina-answer-for-the-hungry.html>>. Acessado em setembro de 2015.
- BACHÈRE, E. *et al.* Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 149-168, Apr. 2004.
- BARBIERI, R. C. J.; OSTRENSKY, A.N. Camarões marinhos – Engorda. 1. ed. Viçosa. **Aprenda Fácil**, 352p, 2002.

- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Inmunología del Camarón. In: VIELKA, M. Q.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.), Guía Práctica de Patología y Inmunología de Camarones Penaeidos, **ED. CYTED**, p.169-224, 2008.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances em la Inmunología del Camarón. In: VIELKA, M. Q.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.), Guía Técnica de Patología y Inmunología de Camarones Penaeidos, **ED. CYTED**, p.237-288, 2014.
- BARROSO, F. E. C.; RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Efeito do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* nas pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agrônômica**, v,38, n.1, p.58-63, 2007.
- BENELHADJ, S.; GHARSALLAOUI, A.; DEGRAEVE, P.; ATTIA, H.; GHORBEL, D. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. **Food Chemistry**, n. 194, p. 1056-1063, 2016.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B.; REBELO, A. M. Biorremediação de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris*. **Evidência**, v. 7, n. 2, p. 85-92, 2007.
- BERTOLIN, T. E.; PILATTI, D.; GIACOMINI, A. C. V. V.; BAVARESCO, C. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Effect of microalga *Spirulina platensis (Arthrospira platensis)* on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1253-1259, 2009.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 5, p. 64-76, 2000.
- BOYD, C. E. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. **Aquaculture**, n.226, p.101-112, 2003.
- BOYD, C. E., TUCKER, C. S. **Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwer Academic Publisher**, 1998.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.249-254, 1976.
- BRASIL. Lei nº 11.959, de 29 de junho de 2009. Dispõe sobre a Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca, regula as atividades pesqueiras, revoga a Lei no 7.679, de 23 de novembro de 1988, e dispositivos do Decreto-Lei nº 221, de 28 de fevereiro de 1967, e dá outras providências. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Poder Legislativo, Brasília, DF, 30 jun. Seção 1, p. 1, 2009.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010**. Brasília, 2012.

BULET P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 169-184, 2004.

CAMPA-CÓRDOVA, A. I. *et al.* Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, n. 4, p.353–366, 2002.

CANTELLI, L. **Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria birdie* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com o vírus dasíndrome da mancha branca (WSSV)**. 2009. 68f. Dissertação (Pós-graduação em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v.198, n. 1, p.116-126, 2004.

CERENIUS, L.; LEE, B. L.; SODERHALL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 6, p. 263-271, 2008.

CERENIUS, L.; BABU, R.; SODERHALL, K.; JIRAVANICHPAISAL, P. In vitro effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 1, p. 21–23, 2010.

CHANG, Y. P.; LIU, C. H.; WU, C. C.; CHIANG, C. M.; LIAN, J. L. Dietary administration of zingerone to enhance growth, non-specific immune response, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. **Fish and Shellfish immunology**, v.32, p. 284-290, 2012.

CHANG, Z.; DUAN, P.; XU, Y. Catalytic hydrolysis of microalgae: Influence of operating variables on the formation and composition of bio-oil. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 349-354, 2015.

CHEN, Y. Y.; CHEN, J. C.; LIN, Y. C.; PUTRA, D. F.; KITIKIEW, S.; LI, C. C.; HSIEH, J. F.; LIOU, C. H.; YEH, S. T. Shrimp that have received carrageenan via immersion and diet exhibit immunocompetence in phagocytosis despite a post-plateau in immune parameters. **Fish and Shellfish Immunology**, n. 36, p. 352-366, 2014.

CHEN, S.; YU, J.; WANG, W.; YUY, H.; QUAN, X. A pilot-scale coupling catalytic ozonation-membrane filtration system for recirculating aquaculture wastewater treatment. **Desalination**, v. 363, p. 37-43, 2015.

CHOTIGEAT, W. *et al.* Effect of fucoïdan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 233, p. 23-30, 2004.

CHUNTAPA, B.; POWTONGSOOK, S.; MENASVETA, P. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. **Aquaculture**, v. 220, p. 355-366, 2003.

COELHO, A. A. da C. **Cultivo integrado de juvenis de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a microalga *Spirulina platensis*: uma alternativa para tratamento de**

efluente aquícola, 2012. 43f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

COSTA, A. M. **Parâmetros hemato-imunológicos em camarões *Litopenaeus vannamei* durante o avanço da infecção pelo vírus da monecrose infecciosa (IMNV)**, 2008. 51f. Dissertação (Pós-graduação em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; SILVA, G. C.; VIEIRA, R. H. S. F.; SAMPAIO, S. S. Susceptibilidade "in vitro" a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará Nota prévia. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 45, n. 6, p. 458-462, 2008.

COUTTEAU, P. Micro-algae. In: LAVENS, P.; SORGELLOOS, P. (Eds.). **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. Rome: FAO, p. 7-48. (FAO Fisheries Technical Paper, n. 361). 1996.

CUÉLLAR-ANJEL, J. Métodos para el Diagnóstico de Enfermedades en Camarones Penaeidos. In: VIELKA, M. Q.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.), **Guía Técnica de Patología y Inmunología de Camarones Penaeidos**, ED. CYTED, p.21-91, 2014.

CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 68-87, 2010.

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

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DESTOMIEUX, D.; BULET, P.; STRUB, J. M.; van DORSSELAER, A.; BACHÈRE, E. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, p. 335-346, 1999.

DIETRICH, C.P. *et al.* 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.

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

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, n. 3, p.350-354, 1956.

- FAO, **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. FISHSTAT, 2010.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2012**. FISHSTAT, 2012.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**. FISHSTAT, 2014.
- FARIAS, W.R.L. *et al.* Enhancement of growth in tilapia larvae (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from the red marine alga *Botryocladia occidentalis*. **Revista Ciência Agronômica**. Fortaleza, CE. v. 35, Número Especial, p. 189–195, 2004.
- 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 white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, n. 6, p 673-685, 2007.
- GAFFNEY, M.; O'ROURKE, R.; MURPHY, R. Manipulation of fatty acid and antioxidant profiles of the microalgae *Schizochytrium* sp. through flax seed oil supplementation. **Algal Research**, v. 6, p. 195-200, 2014.
- GEORGE, B.; PANCHA, I.; DESAI, C.; CHOKSHI, K.; PALIWAL, C.; GOSH, T.; MISHRA, S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 367-374, 2014.
- GJEDREM T.; ROBINSON N.; RYE M. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. **Aquaculture**, v. 350-353, n. 1, p. 117-119, 2012.
- GROSS, P. S. *etal.* Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of haemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*. **Developmental & Comparative Immunology**, v.25, p.565-577, 2001.
- HENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Tratamento de efluentes de carcinicultura por macrófitas aquáticas flutuantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 181-188. 2008.
- HOEBE, K.; JANSSEN, E.; BEUTLER, B. The interface between innate and adaptative immunity. **Nature Immunology**, v.5, n.10, 971-974, 2004.
- HOU, W. Y.; CHEN, J. C. The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 19, n. 2, p. 127-138, 2005.
- HUYNH, T. G.; YEH, S. T.; LIN, Y. C.; SHYU, J. F.; CHEN, L. L.; CHEN, J. C. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinensis* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, 286-293, 2011.

- IBRAHEM, M. D.; MOHAMED, F. M.; IBRAHIM, M. A. The role of *Spirulina platensis* (Arthrospira platensis) in growth and immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its resistance to bacterial infection. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 6, p. 109 – 117, 2013.
- IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 128-150, 2005.
- JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, California, v. 20, p. 197-216, 2002.
- JIRAVANICHPAISAL, P; LEE, B.L; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, p. 213-236, 2006.
- JOURDAN, J. P. **Teaching manual: grow your own Spirulina**. Genebra: Suíça. 2001.
- KALIKOSKI C. D.; SEIXAS C. S.; ALMUDI T. Gestão compartilhada e comunitária da pesca no Brasil: avanços e desafios. **Ambiente & Sociedade**, v. 12, n. 1, p. 151-172, 2009.
- KUBTIZA, F. O status atual e as tendências da tilapicultura no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 21, n. 124, p.10-19, 2011.
- KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, K. S. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6012-6018, 2010.
- KURD, F.; SAMAVATI, V. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: extraction and in-vitro anti-cancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 498-506, 2015.
- LANLAN, Z.; LIN, C.; JUNFENG, W.; YU, C.; XIN, G.; ZHAOHUI, Z.; TIANZHONG, L. Attached cultivation for improving the biomass productivity of *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, n. 181, p. 136-142, 2015.
- LEE, S. Y.; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, n. 5, p. 421-437, 2002.
- LEE, I.; HAN, J. I. Simultaneous treatment (cell disruption and lipid extraction) of wet microalgae using hydrodynamic cavitation for enhancing the lipid yield. **Bioresource Technology**, v. 186, p. 246-251, 2015.
- LE MOULLAC, G.; HAFNER, P. Enviromental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, Amsterdam, v.191, n. 1-3 p.121-131, 2000.
- LIMA, P. C. W. C.; TORRES, V. M.; RODRIGUES, J. A. G.; SOUSA, J. J.; FARIAS, W. R. L. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* em juvenis de *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, n.1, p.79-85, 2009.

LIMA, F. T. **Capacidade de retenção e dinâmica de um “wetland” construído no tratamento de águas residuais.** 2011. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2011.

LIN, Y. C.; VASEEHARAN, B.; KO, C. F.; CHEN, J. C. Molecular cloning and phylogenetic analysis on α 2-macroglobulin (α 2-M) of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 4, p. 317-329, 2008.

LIN, Y. G.; TAYAG, C. M.; HUANG, C. L.; TSUI, W. C.; CHEN, J. C. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, n. 6, p. 1092-1098, 2010.

LIN, Y. C.; YEH, S. T.; LI, C. C.; CHEN, L. L.; CHENG, A. C.; CHEN, J. C. An immersion of *Gracilaria tenuistipitata* extract improves the immunity and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with white spot syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, v.31, 1239-1246, 2011.

LIN, Y. C.; CHEN, J. C.; LI, C. C.; MORNI, W. Z. W.; SUHAILI, A. S. N. A.; KUO, Y. H.; CHANG, Y. H.; CHEN, L. L.; TSUI, W. C.; CHEN, Y. Y.; HUANG, C. L. Modulation of the innate immune system in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long-term low salinity exposure. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, p. 324-331, 2012.

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

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**, São Carlos: Rima, v. 1, p. 295-315, 2006.

MARAN, J. P.; MEKALA, V.; MANIKANDAN, S. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from *Cucurbita moschata*. **Carbohydrate Polymers**, n. 92, p. 2018-2026, 2013.

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (bluegreen algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3389–3401, 2011.

MARTÍN, L.; CASTILLO, N. M.; ARENAL, A.; RODRIGUEZ, G.; FRANCO, R.; SANTIESTEBAN, D.; SOTOLONGO, J.; FORRELLAT, A.; ESPINOSA, G.; CARRILLO, O.; CABRERA, H. Ontogenetic changes of innate immune parameters from eggs to early postlarvae of white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). **Aquaculture**, v 358-359, p. 234-239, 2012.

McEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. **Hormones and Behavior**, p. 105 – 111, 2010.

McEWEN, B. S.; GIANAROS, P. J. Stress and allostasis-induced brain plasticity. **Annual Review of Medicine**, v. 62, p. 431 – 445, 2011.

MILANEZ, S. **Efeito da dieta suplementada com a cianobacteria *Arthrospira platensis* em camarões *Litopenaeus vannamei* sobre a imunocompetência e sobrevivência à infecção pelo vírus da mancha branca.** 2014. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MOHAN, S. V.; ROHIT, M. V.; CHIRANJEEVI, P.; CHANDRA, R.; NAVANEETH B. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 169-178, 2015.

MUÑOZ, M.*et al.* Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 11 p. 2678-2689, 2002.

NAPPI, A. J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioessays**, v. 22, n. 5, p. 469-480, 2000.

NARDOCCI, G.; NAVARRO, C.; CORTÉS, P. P.; IMARAI, M.; MONTOYA, M.; VALENZUELA, B.; JARA, P.; ACUÑA-CASTILLO, C.; FERNÁNDEZ, R. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 40, p. 531 – 538, 2014.

NOGUEIRA, S. M. S. **Tratamento de efluentes de cultivos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a microalga *Spirulina platensis*.** 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura ameaçada: Produtores sofrem com a mortalidade decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 83, p. 37-51, 2004.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.459-466, 2003.

OZÓRIO, R. A. **Desempenho zootécnico, enzimas digestivas e imunocompetência em camarões *Litopenaeus vannamei* alimentados com dieta suplementada com extrato de polissacarídeo da microalga *Porphyridium cruentum*.** 2013. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

PERAZZOLO, L. M.; BACHERE, E.; ROSA, R. D.; GONÇALVES, P.; ANDREATTA, E. R.; DAFFRE, S.; BARRACCO, M. A. Alpha2-macroglobulin from an Atlantic shrimp: Biochemical characterization, sub-cellular localization and gene expression upon fungal challenge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, p. 938-943, 2011.

POSTEN, C.; SCHAUB, G. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels-A process view. **Journal of Biotechnology**, v.142, p.64-69, 2009.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p.635-648, 2004.

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

RANZANI-PAIVA, M. J.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Ed. Eduem, Maringá. 1ª ed. 140 p., 2013.

RATTANACHAI, A. *et al.* Molecular cloning and expression analysis of alpha2-macroglobulin in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, n. 5, p. 599-611, 2004.

REDDY, K.V.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 24, n. 6, p. 536-547, 2004.

RICHARDS R.G.; MULLINS B.J. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. **Ecological Modelling**, v. 249, n. 24, p. 59-67, 2013.

RIDLER, N.; BARRINGTON, K.; ROBINSON, B.; WOWCHUK, M.; CHOPIN, T.; ROBINSON, S.; PAGE, F.; REID, G.; SZEMERDA, M.; SEWUSTER, J.; BOYNE-TRAVIS, S. Integrated multitrophic aquaculture. Canadian project combines salmon, mussels, kelps. **Global Aquaculture Advocate**, v.10, p.52-55, 2007.

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

RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofíceia *Halimena pseudofloresia* mediante estratégia profilática. **Revista Ciência Agrônômica**, v.40, n.1, p.71-78, janeiro-março, 2009.

RODRIGUES, P. H. A. **Imunoestimulação de camarões *Litopenaeus vannamei* alimentados com ração suplementada com a cyanobacteria *Spirulina platensis***. 2012. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

RODRÍGUEZ, J.; LE MOULLAC, G. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. **Aquaculture**, v.191, n. 1-3, p.109-119, 2000.

SABOYA, J. P. S. **Teores de β -Caroteno e α -tocoferol presentes na microalga *Spirulina (Arthrospira) Platensis* cultivada com diferentes fotoperíodos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2010.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**. Amsterdam, v, 172, n. 1-2, p. 63-69. Mar. 1999.

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

SANGSURIYA, P.; CHAROENSAPSRI, W.; CHOMWONG, S.; SENAPIN, S.; TASSANAKAJON, A.; AMPARYUP, P. A shrimp pacifastin light chain-like inhibitor: Molecular identification and role in the control of the prophenoloxidase system. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 54, p. 32-45, 2016.

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

SHIN, D. Y.; CHO, H. U.; UTOMO, J. C.; CHOI, Y.; XU, X.; PARK, J. M. Biodiesel production from *Scenedesmus bijugagrown* in anaerobically digested food wastewater effluent. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 215-221, 2015.

SILI, C.; TORZILLO, G.; VONSHAK, A. *Arthrospira* (Spirulina). In: WHITTON, B. A. (ED.). Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time. **ED. Springer**, p. 677-705, 2012.

SILVA, J. W. A. **Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em efluentes aquícolas e sua influência na concentração lipídica**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

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

SODERHALL, K.; HALL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **Biochimica et Biophysica Acta**. n. 797, p. 99-104, 1984.

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

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

SUBHADRA, B.; EDWARDS, M. An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in United States. **Energy Policy**, v. 38, n. 9, p. 4897-4902, 2010.

SUH, S. S.; KIM, S. J.; HWANG, J.; PARK, M.; LEE, T.K.; KIL, E. J.; LEE, S. Fatty acid methyl ester profiles and nutritive values of 20 marine microalgae in Korea. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 191-196, 2015.

TAHMASEBI, A.; KASSIM, M. A.; YU, J.; BHATTACHARYA, S. Thermogravimetric study of the combustion of *Tetraselmis suecica* microalgae and its blend with a Victorian brown coal in O₂/N₂ and O₂/CO₂ atmospheres. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 15-27, 2013.

TALPUR, A. D.; IKHWANUDDIN, M.; AMBOK-BOLONG, A. M. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale*) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* and disease resistance against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, n. 400, p. 46–52, 2015.

- TAKAHASHI, Y. *et al.* Efficacy of oral administration of fucoidan, a sulphated polysaccharide, in controlling White spot syndrome in kuruma shrimp in Japan. In: **ADVANCES IN SHRIMP BIOTECHNOLOGY. NATIONAL CENTER FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY**, Bangkok, v,1, p. 171–173, 1998.
- TAYAG C. M; LIN Y-C; LI C-C; LIOU C-H; CHEN, J-C. Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, n. 5-6, p. 764-773, 2010.
- TEIMOURI, M.; AMIRKOLAIE, A. K.; YEGANEH, S. The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, n. 396, p. 14–19, 2013.
- TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, Hoboken, v. 80, n. 6, p. 717-735, 2005.
- TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p. 3-19. 2004.
- TONGANUNT, M.; PHONGDARA, A.; CHOTIGEAT, W.; FUJI, K. Identification and characterization of syntenin binding protein in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Journal of Biotechnology**, v. 120, n. 2, p. 135-145, 2005.
- TROELL, M.; JOYCE, A.; CHOPIN, T.; NEORI, A.; BUSCHMANN, A. H.; FANG, J. G. Ecological engineering in aquaculture – Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. **Aquaculture**, v. 297, n.1–4, p.1–9, 2009.
- VARGAS-ALBORES, F. Herramientas para determinar inmunoestimulación. In: MEMORIALS DEL SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN AQUICOLA, 6., Cancun. **Anais...** Cancun:[nd], p.48-52, 2002.
- VASEEHARAN, B.; LIN, Y. C.; KO, C. F.; CHIOU, T. T.; CHEN, J. C. Molecular cloning and characterisation of a thioester-containing alpha2-macroglobulin (alpha2-M) from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, p. 115-130, 2007.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, p. 139-145. 2004.
- WAHLEN, B. D.; WILLIS, R. M.; SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2724-2730, 2011.
- WANG, X. W.; WANG, J. X. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 39, p. 27-38, 2013.

WATANUKI, H.; OTA, H.; TASSAKKA, A. C. M. A. R.; KATO, T.; SAKAI, M. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 258, n. 1-4, p. 157-163, 2006.

WU, C. C.; CHANG, Y. P.; WANG, J. J.; LIU, C. H.; WONG, S. L.; JIANG, C. M.; HSIEH, S. L. Dietary administration of *Gynura bicolor* DC water extract enhances immune response and survival rate against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, n. 42, p. 25-33, 2015.

YEGANEH, S.; TEIMOURI, M.; AMIRKOLAIE, A. K. Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Research in Veterinary Science**, n. 101, p. 84-88, 2015.

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 and Shellfish Immunology**, v. 20, n. 3, p. 332-345, 2006.

YEH, S. T.; CHEN, J. C. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed early recovery in immunity after a *Vibrio alginolyticus* injection. **Fish and Shell Immunology**, v. 26, p. 724-730, 2009.

YEH, S.T.; LIN, Y. C.; HUANG, C. L.; CHEN, J. C. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed protective innate immunity and up-regulation of gene expressions after low-salinity stress. **Fish and Shellfish Immunology**, v.28, n. 5-6, p.887-894, 2010.