

EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA VERMELHA *Halymenia pseudofloresia* NA SOBREVIVÊNCIA DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*

Effect of sulfated polysaccharides extracted from the red alga *Halymenia pseudofloresia* on survival of the shrimp *Litopenaeus vannamei*

José Ariévilto Gurgel Rodrigues¹, Kelma Maria dos Santos Pires², Glacio Souza Araújo³, Valeska Martins Torres⁴, Daniel Barroso de Alencar⁵, Wladimir Ronald Lobo Farias⁶

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de polissacarídeos sulfatados (PS), extraídos da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*, na sobrevivência do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, submetido à condições de estresse. Os PS foram extraídos através de digestão enzimática, a partir de algas marinhas coletadas na Praia de Fleixeiros/CE. O experimento constou de três tratamentos com diferentes doses de PS (0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 1,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 1,0 mg.L^{-1}), administradas através de banhos de imersão, e um controle, sem PS, com três repetições cada. O experimento teve uma duração de 20 dias, dos quais os primeiros 15 dias foram para a aplicação dos banhos de imersão e os últimos 5 dias para a indução do estresse, através da supressão da troca de água do cultivo. A administração das doses foi realizada, duas vezes por dia, após as trocas de água e antes da alimentação dos animais. Após a indução do estresse, os camarões do tratamento 1,0 mg.L^{-1} apresentaram uma mortalidade significativamente menor do que as observadas nos tratamentos controle e 0,5 mg.L^{-1} . Ao final do experimento, os camarões do tratamento 1,0 mg.L^{-1} também foram submetidos a uma extração de PS e o fracionamento destes, em coluna de DEAE-celulose, resultou em um perfil cromatográfico semelhante do obtido para os PS extraídos da alga marinha. Os resultados mostraram que a administração de 1,0 mg.L^{-1} de PS de *H. pseudofloresia* foi capaz de reduzir a mortalidade do camarão *L. vannamei* submetido à condições de estresse.

Palavras-chaves: *Halymenia pseudofloresia*, *Litopenaeus vannamei*, polissacarídeos sulfatados, sobrevivência.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of sulfated polysaccharides (SP) extracted from the red marine alga *Halymenia pseudofloresia* on the survival rate of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, submitted to stress conditions. The SP were extracted through enzymatic digestion from marine algae collected in Praia de Fleixeiros-CE. The experiment consisted of three treatments with different doses of SP (0.5 and 1.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 1.0 mg.L^{-1}) fed through immersion baths and a control without SP, each one with three replications. The experiment had a 20 days (20-day) duration, which the first 15 days were used to immersion baths application, and the last 5 days were used to stress induction by culture water exchange suppression. Doses application was done twice a day after water exchange and before the animals' feeding. After stress induction shrimp mortality of 1.0 mg.L^{-1} treatment was significantly lower than that of control and 0.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ treatment. At the end of the experiment 1.0 mg.L^{-1} treatment shrimps were also submitted to a SP extraction, and the DEAE-celulose column chromatography of these SP resulted in a similar profile of that obtained from the marine alga. The results showed that 1.0 mg.L^{-1} application of SPs from *H. pseudofloresia* was capable to reduce mortality of *L. vannamei* shrimps submitted to stress conditions.

Key words: *Halymenia pseudofloresia*, *Litopenaeus vannamei*, sulfated polysaccharide, survival.

¹ Pesquisador-colaborador do Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza. E-mail: arieviloengpesca@yahoo.com.br, ² Doutoranda em Engenharia de Pesca, Bolsista da FUNCAP, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará. E-mail: kelmapires@gmail.com, ³ Doutorando em Engenharia de Pesca, bolsista da CAPES, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará. E-mail: glacio@ufc.br, ⁴ Mestranda em Engenharia de Pesca, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará. E-mail: valeskamtorres@gmail.com, ⁵ Mestrando em Engenharia de Pesca, bolsista do CNPq, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará. E-mail: danielpeca@gmail.com, ⁶ Professor Associado do Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará. E-mail: wladimir@ufc.br

INTRODUÇÃO

O cultivo do camarão-cinza, *Litopenaeus vannamei*, tornou o Brasil uma referência no Hemisfério Sul (Rocha & Rodrigues, 2004), principalmente, os Estados do Rio Grande do Norte e Ceará, com este último se destacando pelas maiores produtividades (Abcc, 2006). Em poucos anos, a espécie ganhou popularidade, sendo favorecida ainda pelas adequadas condições climáticas, as quais levaram a espécie a apresentar altas produtividades, crescimento uniforme e fácil adaptabilidade (P.t.c.m.c., 2001). Entretanto, na aquicultura intensiva, os organismos ficam expostos a diversos níveis de estresse, tanto de natureza físico-química como biológica. As altas densidades de estocagem, a presença de grandes quantidades de alimento e os dejetos dos organismos elevam os níveis de matéria orgânica e bactérias, prejudicando a qualidade da água e causando doenças (Vadstein, 1997).

Assim, nos últimos anos, o País passou a enfrentar diversos problemas devido ao surgimento de doenças bacterianas e virais, o que reduziu acentuadamente a produção do crustáceo (Nunes *et al.*, 2004). Dentre as doenças viróticas que afetam o camarão destacam-se a necrose hepatopancreática (NHP), a mionecrose infecciosa (IMNV) (Bucheli *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004) e a síndrome da mancha branca (WSSV) (Nunes & Martins, 2002), esta última confirmada inicialmente no Estado de Santa Catarina em janeiro de 2005, pelo Ministério da Agricultura (Jurgenfeld, 2005). Em junho do mesmo ano, o DNA da WSSV foi detectado em camarões oriundos de cultivos realizados no município de Aracati-CE (Gesteira, 2006).

Visando a minimizar maiores perdas, várias práticas são utilizadas para combater o surgimento de doenças na aquicultura, tais como profilaxia sanitária, desinfecção, uso de antibióticos e vacinas contra doenças específicas. Porém, algumas dificuldades estão associadas ao emprego de medicamentos, como os antibióticos, que pode provocar um aumento na resistência microbiana e acúmulo de resíduos nos tecidos de peixes (Cook *et al.*, 2003). Por outro lado, vários estudos têm sugerido o uso de imunostimulantes na prevenção de doenças na aquicultura como os fatores nutricionais lactoferrina e as vitaminas B e C, além de fatores hormonais como a prolactina. Outros compostos, extraídos de vários organismos, tais como os polissacarídeos quitina, obtido do exoesqueleto de crustáceos, o β -glucano, presente nas paredes celulares de fungos e leveduras e os polissacarídeos sulfatados (PS) de algas também têm apresentado efeitos imunostimulantes. Esses

compostos ativam principalmente a fagocitose e a atividade antibacteriana das células de defesa contra patógenos e seus metabólitos (Sakai *et al.*, 1992; Sakai, 1999; Campa-Córdova *et al.*, 2002; Rivera *et al.*, 2002; Farias *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006). Além do efeito imunostimulante, os PS de algas marinhas também são conhecidos por possuir outras propriedades biológicas, tais como antiviral, anticoagulante e antitrombótica (Hayashi *et al.*, 1996; Farias *et al.*, 2001).

A imunostimulação resulta em um melhor desenvolvimento dos animais e/ou no aumento da sobrevivência, quando os mesmos são expostos a situações de estresse (Sakai, 1999). Campa-Córdova *et al.* (2002) reportaram um aumento na capacidade oxidativa dos hemócitos de juvenis do camarão *L. vannamei*, após imersão dos animais em soluções de β -glucano e de um PS extraído de uma microalga cianofíceia. Costa *et al.* (2006) incorporaram na ração de indivíduos dessa espécie, infectados pelo vírus da mionecrose infecciosa IMNV, PS extraídos da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*, sendo observado um significativo aumento na sua taxa de sobrevivência. Quando esses PS também foram administrados, através de banhos de imersão, em pós-larvas do camarão *L. vannamei*, foi observado uma redução significativa da mortalidade (Barroso *et al.*, 2007).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da administração dos polissacarídeos sulfatados, extraídos da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*, na sobrevivência e desenvolvimento de camarões, *L. vannamei*, submetidos à condições de estresse.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das algas e extração dos polissacarídeos

A alga marinha vermelha *H. pseudofloresia* foi coletada na Praia de Fleixeiras, município de Trairi-CE. No laboratório, as algas foram lavadas com água destilada, desidratadas e cortadas em pequenos pedaços.

Para a extração dos PS, a alga seca (5 g) foi hidratada com 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5mM e, em seguida, foram adicionados 17 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg.mL⁻¹), sendo a mistura incubada em banho-maria (60 °C; 24 h). Após a incubação, o material foi filtrado, centrifugado (8.000 x g; 4 °C; 20 min.) e, ao sobrenadante, foram adicionados 16 mL de CPC (cloreto de cetilpiridinium) 10% para precipitação dos PS (25 °C; 24 h). Logo após a precipitação, o material foi lavado com 500 mL de CPC

0,05%, dissolvido em 305 mL de NaCl 2M:etanol absoluto (100:15; v/v) e submetido a uma nova precipitação (4 °C; 24 h), através da adição de mais 174 mL de etanol absoluto. Em seguida, o material foi centrifugado (8.000 x g; 4 °C; 20 min.) e submetido a duas lavagens com 500 mL de etanol 80% e uma lavagem com o mesmo volume de etanol absoluto, sendo, finalmente, seco em estufa (60 °C; 24 h).

Aquisição e manejo dos camarões marinhos

Aproximadamente 500 exemplares adultos do camarão *L. vannamei*, aclimatados em água doce, foram obtidos de uma fazenda de cultivo, no Município de Jaguaruana, Estado do Ceará. Os camarões foram transportados (3 h) em sacos plásticos 2 ind. L⁻¹, contendo água do viveiro e 2/3 de oxigênio, dentro de caixas isotérmicas. No laboratório, os animais foram aclimatados (30 min.) em uma caixa d'água de 500 L e, em seguida, estocados em aquários, permanecendo sob observação durante uma semana para que se recuperassem do estresse causado pelo transporte. Durante este período, foram realizadas, diariamente (8:00h e 16:00h), duas trocas parciais de 25% da água de cada aquário, sendo também retirados os restos de ração e dejetos dos animais. A alimentação foi fornecida *ad libitum*, em duas refeições diárias, utilizando ração com 35% de proteína bruta. Após a quarentena, o mesmo manejo também foi adotado durante o período experimental.

Delimitação experimental e análise estatística

Para o início do experimento, camarões com peso médio de 8,19 g foram estocados, aleatoriamente, em aquários contendo 38 L de água doce numa densidade de 0,3 camarões.L⁻¹.

O experimento constou de quatro tratamentos com três repetições, sendo um controle sem a adição de PS e mais três tratamentos, com PS, nas concentrações de 0,5 µg.L⁻¹, 1,5 µg.L⁻¹ e 1,0 mg.L⁻¹. As diferentes doses foram administradas através de duas aplicações diárias (9:00h e 17:00h), sempre após as trocas de água. Para isso, inicialmente, os PS foram dissolvidos em um pequeno volume de água destilada e, em seguida, as diferentes soluções foram adicionadas na água de cada aquário. A temperatura e o pH da água, bem como as concentrações de oxigênio dissolvido e amônia foram monitoradas semanalmente. O experimento teve duração de 20 dias, sendo 15 dias de administração dos PS e 5 dias de estresse, o qual foi induzido suprimindo-se a renovação de água dos cultivos.

Ao final do experimento, os animais foram contados, pesados, sacrificados e estocados (-20 °C).

Os dados de mortalidade foram submetidos à uma Análise Variância com fator único (ANOVA) e teste t independente para médias. Para todos os testes, foi adotado um nível de significância de 5%.

Extração dos polissacarídeos sulfatados

A extração dos PS dos camarões foi realizada a partir de três indivíduos descabeçados e descascados de dois diferentes grupos de camarões, um não exposto aos PS e outro submetido à maior dose de PS (1,0 mg.L⁻¹). Para isso, a parte muscular foi lavada com água destilada e levada para secagem em estufa (40°C; 24 h). O material seco (1,2 g) foi hidratado com 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5mM e, em seguida, foram adicionados 10% de uma solução de papaína bruta (30 mg.mL⁻¹), sendo a mistura incubada em banho-maria (60°C; 24 h). Após a incubação, o material foi filtrado, centrifugado (8.000 x g; 4°C; 30 min.) e, ao sobrenadante, foram adicionados 4 mL de CPC 10% para precipitação dos PS (25°C; 72 h). Logo após a precipitação, o material foi lavado com 120 mL de CPC 0,05%, dissolvido em 42 mL de NaCl 2M:etanol absoluto (100:15; v/v) e submetido a uma nova precipitação (4°C; 24 h), através da adição de mais 75 mL de etanol absoluto. Após a precipitação, o material foi centrifugado (8.000 x g; 4 °C; 30 min.) e submetido a duas lavagens com 120 mL de etanol 80% e uma lavagem com 75 mL de etanol absoluto, sendo finalmente seco em estufa (60°C; 48 h).

Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados

Os PS extraídos da alga marinha e dos camarões foram fracionados em uma coluna de troca iônica DEAE-celulose acoplada a um coletor de frações. A coluna, com 1,5 cm de diâmetro e 6,5 cm de altura foi, inicialmente, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5mM. Em seguida, foi aplicado, no topo do gel, 1,0 mL de uma solução de PS e o fluxo da coluna ajustado para 60 mL.h⁻¹. Os PS foram eluídos, passo a passo, utilizando soluções com diferentes concentrações de NaCl (0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50; 1,75 e 2,0 M), preparadas no próprio tampão de equilíbrio. Durante a eluição da coluna, foram coletadas frações de 5 mL e a presença dos PS foi evidenciada através da reação metacromática. Para isso, 200 µL de cada fração foram misturados com 1 mL de azul-dimetil-dimetileno (DMB) e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 525 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sustentabilidade e o desenvolvimento da carcinicultura, na grande maioria dos países produtores, estão praticamente estagnados devido ao aumento de problemas ecológicos e patológicos advindos da intensificação da atividade. O estudo da imunologia dos camarões surge, então, como um elemento chave para o estabelecimento de estratégias destinadas ao controle de doenças. Assim, as pesquisas devem ser direcionadas para o desenvolvimento de ensaios com o objetivo de avaliar e monitorar o estado imunológico destes animais submetidos a cultivos sob condições de estresse (Bachere, 2000).

Neste trabalho, camarões da espécie *L. vannamei* foram expostos a) diferentes doses de PS através de banhos de imersão e foi induzida nos cultivos uma situação de estresse, gerada pela não renovação de água, a fim de se avaliar a resistência dos animais às condições adversas.

Durante as duas primeiras semanas de imersão, não houve diferenças significativas entre as mortalidades dos camarões nos diferentes tratamentos. Entretanto, na terceira semana, durante o período de indução do estresse, os camarões do tratamento 1,0 mg.L⁻¹ apresentaram uma mortalidade significativamente menor do que a dos tratamentos-controles (s/PS) e 0,5 µg.L⁻¹, não diferindo da observada no tratamento 1,5 µg.L⁻¹ (Figura 1).

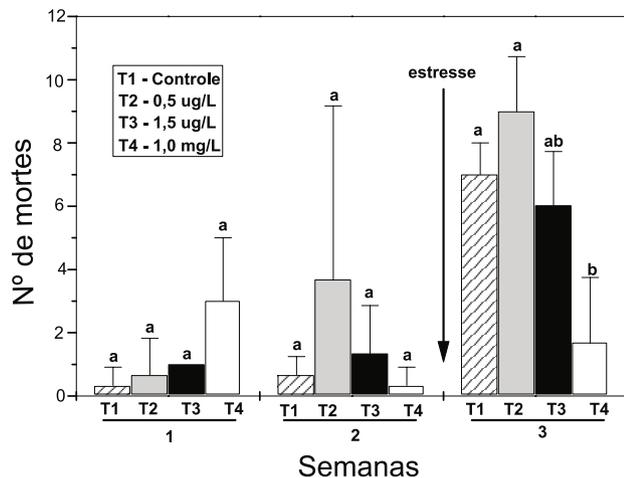


Figura 1 - Mortalidade semanal dos camarões *L. vannamei*, por tratamento, durante o período experimental. Letras diferentes sobre as barras de erro indicam diferenças significativas ao nível de 5%.

Ao final de 20 dias de cultivo, os animais do tratamento 1,0 mg.L⁻¹ apresentaram a maior sobrevivência, resultando na maior biomassa final viva. Já os camarões dos tratamentos controle (s/PS) e 0,5 µg.L⁻¹ morreram todos durante os primeiros dias de in-

dução do estresse. No tratamento 1,5 µg.L⁻¹, sobreviveram alguns animais apenas em uma das três repetições, não apresentando, assim, biomassa final viva significativamente diferente dos tratamentos controle e 0,5 µg.L⁻¹ (Figura 2).

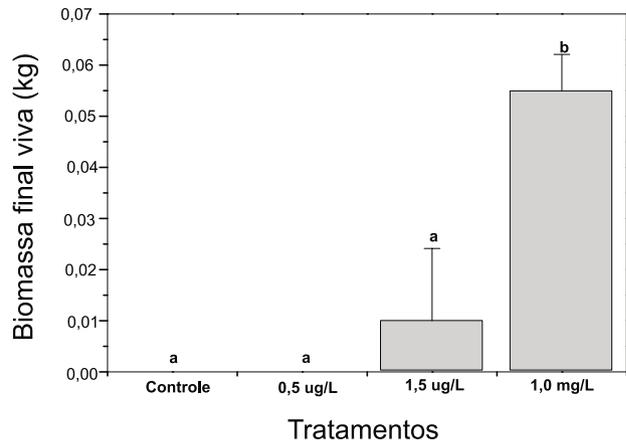


Figura 2 - Biomassa final viva (kg) da espécie *L. vannamei* ao término do período de cultivo. Letras diferentes sobre as barras de erro indicam diferenças significativas ao nível de 5%.

Campa-Córdova *et al.* (2002) avaliaram as ações de um polissacarídeo sulfatado, extraído de uma microalga cianofíceia, e do β-glucano (não-sulfatado) em alguns parâmetros imunológicos de juvenis do camarão *L. vannamei*. Segundo os autores, os hemócitos e tecidos musculares dos camarões apresentaram elevados níveis de atividade da enzima superóxido dismutase e geração do ânion superóxido, caracterizando a atividade imunestimulante dessas moléculas.

Sajeevan *et al.* (2006) relataram que o uso do extrato da levedura *Candida sake* aumentou a sobrevivência do camarão *Fenneropenaeus indicus* infectado pelo vírus da mancha branca, demonstrando que a incorporação de 10% do extrato da levedura na dieta foi capaz de estimular a resposta imune dos animais por inibição da ação do vírus. Huang *et al.* (2006) reportaram que a adição de 1% do extrato de polissacarídeos, obtido da alga marinha *Sargassum fusiforme*, na ração do camarão *Fenneropenaeus chinensis*, resultou em uma baixa mortalidade acumulativa após 30 h de infecção pela bactéria *V. harveyi*.

O melhor efeito foi obtido com o tratamento 1,0 mg.L⁻¹, o qual resultou em um significativo aumento na sobrevivência dos animais. Por outro lado, não foi observada nenhuma diferença significativa no ganho de peso dos camarões durante o período experimental. Itami *et al.* (1998) relataram que o polissacarídeo β-glucano foi capaz de reduzir o estresse

em camarões, *P. japonicus*, em diversas fases de crescimento e que, com a administração oral do polissacarídeo, foi possível aumentar a sobrevivência, as taxas de crescimento e a atividade fagocitária dos hemócitos dos animais. Além disso, a sobrevivência dos camarões aumentou quando o período de administração do glucano foi prolongado.

A administração de imunostimulantes deve ser bem monitorada, já que alguns podem causar efeitos adversos nos animais. Hauton & Smith (2004) utilizaram os imunostimulantes comerciais MacroGard Aquasole, um β - 1,3 glucano purificado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o Elorisan, um extrato líquido de alga marinha e o HV 5 pentavalente, uma vacina para *Vibrio*, além de dois candidatos a imunostimulantes, um derivado da bactéria *Listonella anguillarum* e um oligodexinucleotídeo sintético, em granulócitos de lagostas da espécie *Homarus gammarus*. Todos os produtos testados apresentaram um efeito citotóxico nos granulócitos das lagostas e que é muito importante utilizar uma dose ideal, seja administrada através de banhos de imersão ou por via oral, já que uma dose exagerada poderá causar algum risco de toxicidade, principalmente, quando aplicados a longo prazo.

Durante a realização deste experimento, os animais submetidos ao tratamento 1,0 mg.L⁻¹ não exibiram nenhum sintoma aparente de toxicidade, pelo contrário, os mesmos responderam muito bem à referida dose, apresentando a menor mortalidade antes e depois do estresse em relação aos animais dos outros tratamentos. Além disso, apresentaram um comportamento bem ativo, maior aptidão alimentar e frequência de mudas em relação aos outros tratamentos, principalmente durante a indução do estresse. De acordo com Azad *et al.* (2005), o uso de imunostimulantes pode ser vantajoso na indução do crescimento, bem como resultar em um aumento da sobrevivência em camarões.

Durante o experimento, a temperatura da água ficou em torno de 26,6 ± 0,24°C, o pH foi de 7,01 ± 0,27, o oxigênio dissolvido atingiu valores de 5,30 ± 0,50 mg.L⁻¹ e a concentração de amônia foi de 1,34 ± 0,68 mg.L⁻¹. Todas as variáveis mantiveram-se dentro dos valores recomendados para o cultivo de *L. vannamei*, com exceção da amônia, que apresentou uma grande variação em todo o período de cultivo (Tabela 1), sendo os valores dos tratamentos controle e 0,5 µg.L⁻¹ significativamente maiores (p < 0,05) do que os obtidos no tratamento 1,5 µg.L⁻¹, mas sem influência sobre a mortalidade dos camarões nos respectivos tratamentos (Figura 1).

Por outro lado, durante o estresse, a concentração da amônia decresceu acentuadamente, em

todos os tratamentos, em relação aos valores encontrados nas duas primeiras semanas do experimento e não apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% (Tabela I). A drástica redução de amônia, durante o período de estresse, é justificada pela redução do número de camarões nos aquários devido à mortalidade, já que a amônia é gerada a partir dos restos alimentares e dejetos dos animais.

Tabela I - Variação da concentração de amônia (mg.L⁻¹) durante o período de cultivo.

Tratamentos	Administração dos PS	Estresse
0,5 µg.L ⁻¹	1,99 ± 0,19 ^a	0,42 ± 0,29 ^a
1,5 µg.L ⁻¹	1,67 ± 0,25 ^b	0,84 ± 0,58 ^a
1,0 mg.L ⁻¹	1,65 ± 0,27 ^{ab}	1,15 ± 0,51 ^a
Controle	2,28 ± 0,17 ^a	0,83 ± 1,05 ^a

Observação: letras iguais, nas colunas, indicam ausência de diferença significativa ao nível de 5%.

Dos camarões submetidos à extração, só foi possível obter PS daqueles do tratamento 1,0 mg.L⁻¹, portanto, apenas daqueles expostos aos PS extraídos da alga. Os fracionamentos dos PS obtidos da alga e camarões, em coluna de DEAE-celulose, foram bastante semelhantes (Figura 3), sendo as únicas diferenças observadas na intensidade da atividade metacromática e na ausência de uma das frações na cromatografia dos PS obtidos dos camarões. O fracionamento dos PS obtidos dos camarões resultou em quatro frações, as quais foram eluídas nas mesmas concentrações de NaCl utilizadas na cromatografia dos PS extraídos da alga marinha, com exceção de uma quinta fração (F5), a qual foi eluída com 1,5 M de NaCl no fracionamento dos PS obtidos da alga, não aparecendo na cromatografia dos PS extraídos dos camarões.

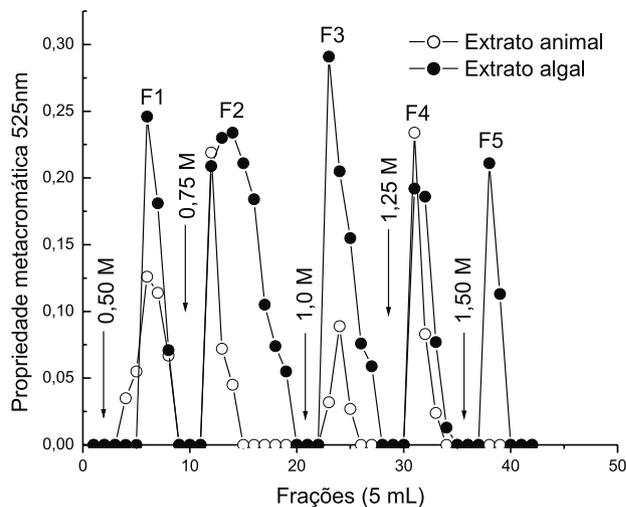


Figura 3 - Cromatografias, em coluna de DEAE-celulose, dos PS obtidos dos camarões e da alga marinha *H. pseudofloresia*.

A semelhança dos perfis cromatográficos, em DEAE-celulose, obtidos nos fracionamentos dos PS extraídos da alga *H. pseudofloresia* e dos camarões do tratamento 1,0 mg.L⁻¹, bem como a não obtenção de PS dos camarões que não foram expostos a nenhuma dose sugere que ocorreu absorção dos PS da alga pelos camarões submetidos ao referido tratamento. Além disso, a redução da atividade metacromática de duas frações (F1 e F3) e a ausência da fração F5, no fracionamento dos PS extraídos dos camarões, indicam que o composto foi possivelmente degradado pelos animais. López et al. (2003) relataram que ao final de 40 dias de administração do β-glucano na dieta de juvenis do camarão *L. vannamei*, ocorreu degradação do polissacarídeo na glândula digestiva por β-glucanases para produzir energia, permitindo o direcionamento de outras proteínas para o crescimento, além de promover um aumento significativo do número de hemócitos nos animais.

Neste trabalho, não foi observada nenhuma diferença significativa no crescimento dos animais expostos aos PS da alga marinha, sugerindo que os mesmos não foram utilizados como fonte de energia pelos animais já que, mesmo no caso da maior dose testada (1,0 mg.L⁻¹) foi utilizada uma quantidade muito pequena de PS diluída na água de cultivo. Não existem relatos da absorção ou degradação de PS de algas marinhas por camarões e, caso isto tenha acontecido neste experimento, as quantidades absorvidas provavelmente foram mínimas, não sendo suficientes para servir como fonte de energia. Por outro lado, o efeito na sobrevivência foi bastante evidente, indicando uma ação imunoestimulante.

De acordo com Johansson et al. (2000), quantidades muito pequenas de β-glucano, na faixa de picogramas, são suficientes para reagir com o sistema imunológico de camarões. No caso dos PS de algas, essas quantidades podem ainda ser bem menores, pois ao comparar a atividade imunoestimulante, através de banhos de imersão em camarões *L. vannamei*, de um PS extraído de uma microalga cianofíca com o β-glucano, Campa-Córdova et al. (2002) obtiveram o mesmo efeito quando utilizaram o PS em uma dose 500 vezes menor (1,0 µg.mL⁻¹) da utilizada com o β-glucano (0,5 mg.mL⁻¹). Por outro lado, Fu et al. (2007) também observaram uma atividade imunoestimulante quando utilizaram doses bem mais elevadas (200, 400 e 600 mg.L⁻¹) dos PS extraídos da alga marinha vermelha *Gelidium amansii*, através de banhos de imersão em *L. vannamei*. No entanto, nenhum aumento no efeito imunoestimulante foi observado quando a dose de imersão foi elevada de 400 para 600 mg.L⁻¹,

A determinação de uma dose ótima de um imunoestimulante é extremamente importante para se obter uma resposta efetiva e vários relatos têm demonstrado que doses baixas surtem um melhor efeito do que doses mais elevadas (Boonyaratpalin et al., 1995; Park & Jeong, 1996; Tinman et al., 2000; Farias et al., 2004), cujo uso prolongado pode causar deformidades durante a fase de pré-muda (Cenaim, 2001).

CONCLUSÕES

A administração de 1,0 mg.L⁻¹ de polissacarídeos sulfatados, extraídos da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia*, na água de cultivo de camarões adultos *L. vannamei* resultou em um aumento significativo da sobrevivência dos animais após a indução de uma situação de estresse, sugerindo um efeito imunoestimulante. No entanto, este efeito não foi traduzido em ganho de peso pelos animais.

Agradecimentos - O presente trabalho contou com o apoio financeiro do MCT/PADCT/CNPq/CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCC. Ministério do Meio Ambiente – Estatística da pesca, em 2004, produção estimada por modalidade, segundo as regiões e unidades da federação. Disponível em <<http://www.mercadodapesca.com.br>>. Acesso em: 2 out. 2006.
- Azad, I.S.; Panigrahi, A.; Gopal, C.; Paulpandi, S.; Mahima, C. & Ravichandran, P. Routes of immunostimulation vis-a-vis survival and growth of *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquaculture*, Amsterdam, v.248, n.1-4, p.227-234, 2005.
- Bachere, E. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 191, n.1-3, p. 1-2, 2000.
- Barroso, F.E.C.; Rodridues, 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*. *Rev. Ciên. Agron.*, Fortaleza, v.38, n.1, p. 58-63, 2007.
- Boonyaratpalin, S.; Boonyaratpalin, M.; Supamataya, K. & Yoride, Y. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune responses, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, p.469-477, in Shariff, M.; Subasighe, R.P. & Arthur, J.R. (eds.), *Diseases in Asian aquaculture*, Vol. 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, 1995.

- Bucheli, P.; Sampaio, J.; Garcia, F. & Carrera, M. A necrose hepatopancreática (NHP) do *Litopenaeus vannamei* - Caracterização e diagnóstico preliminar pelo método de avaliação da deterioração de tecidos (ADT). *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v.14, n.86, p.31-37, 2004.
- Campa-Córdova, A.I.; Hernández-Saavedra, N.Y.; Philippis, R. & Ascencio, F. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulfated polysaccharide. *Fish Shell. Immunol.*, London, v.12, n.4 p.353-366, 2002.
- Cenaim Informa, Boletín Informativo Quincenal, 15 de Noviembre de 2001 WSSV y temperatura, inmestimulantes, vitaminas... Como se relaciona todo?. Disponível em <<http://www.cenaim.espol.edu.ec>>. Acesso em: 9 nov. 2006.
- Chotigeat, W.; Tongsupa, S.; Supamataya, K. & Phongdara, A. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, Amsterdam, v.233, n.1-4, p.23-30, 2004.
- Cook, M.T.; Hayball, P.J.; Hutchinson, W.; Nowak, B.F. & Hayball, J.D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. *Fish Shell. Immunol.*, London, v.14, n.4, p.333-345, 2003.
- Costa, F.H.F.; Farias, W.R.L.; Sampaio, A.H.; Saker-Sampaio, S. Rocha, I.R.C.B.; Pontes, G.C.; Silva, C.M.; Silva-Neto, J.F.; Silva, F.L.S.; Nunes, E.V.; Souza, A.L.F. & Lima-Júnior, T.B. Enhancement of disease resistance against infectious myonecrosis virus (IMNV) of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* by sulfated polysaccharide extracts from the red seaweeds *Botryocladia occidentalis* and *Solieria filiformis*. Feira Nacional de Camarão. Disponível em <<http://www.agriambi.com.br/Revista>>, suplemento 2005, p.25-32. Acesso em: 24 out. 2006.
- Farias, W.R.L.; Nazareth, R.A. & Mourão, P.A.S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. *Thromb. Haemos.*, Stuttgart, v.86, n.6, p.1540-1546, 2001.
- Farias, W.R.L.; Rebouças, H.J.; Torres, V.M.; Rodrigues, J.A.G.; Pontes, G.C.; Silva, F.H.O. & Sampaio, A.H. Enhancement of growth in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from marine algae. *Rev. Ciên. Agron.*, Fortaleza, v.35, n. esp., 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 Shell. Immunol.*, London, v.22, n.6, p. 673-685, 2007.
- Gesteira, T.C.V. Enfermidades infecciosas registradas na carcinocultura brasileira, p.137-158, in Silva-Souza, A.T. *Sanidade de organismos aquáticos no Brasil*. ABRAPOA, Maringá, 2006.
- Hauton, C. & Smith, V.J. In vitro cytotoxicity of crustacean immunostimulants for lobster (*Homarus gammarus*) granulocytes demonstrated using the neutral red uptake assay. *Fish Shell. Immunol.* London, v.17, n.1, p.65-73, 2004.
- Hayashi, K.; Hayashi, T. & Kojima, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: In vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *Aids Research and Human Retroviruses*, Larchmont, v.12, n.15, p.1463-1471, 1996.
- Huang, X.; Zhou, H. Q & Zhang, H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shell. Immunol.*, London, v.20, n.5, p.750-757, 2006.
- Itami, T.; Asano, M.; Tokushige, K.; Kubono, K.; Nakagawa, A.; Takeno, N.; Nishimura, H.; Maeda, M.; Kondo, M. & Takahashi, Y. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, Amsterdam, v.164, n.1-4, p.277-288, 1998.
- Jeney, G.; Galeotti, M.; Volpatti, D.; Jeney, Z. & Anderson, D.P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, Amsterdam, v.154, n.1, p.1-15, 1997.
- Johansson, M. W.; Keyser, P.; Sritunyalucksana, K. & Soderhall, K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, Amesterdam, v.191, n.1-2, p.45-52, 2000.
- Jurgenfeld, V. Suspeita de vírus em camarão de SC. Valor Econômico-SP. Disponível em <<http://www.agribrands.com.br>>. Acesso em: 21 fev. 2005.
- López, N.; Cuzon, G.; Gaxiola, G.; Taboada, G.; Valenzuela, M.; Pascual, C.; Sánchez, A. & Rosas, C. Physiological, nutritional and immunological role of

- dietary beta-1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, Amsterdam, v.224, n.1-4, p.223-243, 2003.
- Nunes, A.J.P. & Martins, C.C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v.12, n.72, p.23-33, 2002.
- Nunes, A.J.P.; Martins, C.C. & Gesteira, T.C.V. Carcinicultura ameaçada - Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v.14, n.83, p.37-51, 2004.
- Park, H.H. & Jeong, H.D. Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharide. *Aquaculture*, Amsterdam, v.143, n.2, p.135-143, 1996.
- P.T.C.M.C. Plataforma tecnológica do camarão marinho cultivado. *Ministério da Agricultura*, CNPq, ABCC, p.26-28, 2001.
- Rivera, G.; Yoong, F.; Riofrio, G. B.; Reinoso, B.; Hurtado, F. & Massuh, P. Inclusion de harina de kelp (*Macrosystis pyrifera*) em alimentos balanceados para camarón. I Congresso Iberoamericano Virtual de Aqüicultura, p.244-252, 2002. Disponível em: <<http://www.civa2003.org>>. Acesso em: 19 mai. 2002.
- Rocha, I.P. & Rodrigues, J. A carcinicultura brasileira em 2003. *Revista da ABCC*, Recife, v.6, n.1, p.30-36, 2004.
- Sajeevan, T. P.; Philip, R. & Singh, I. S. B. Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v.257, n.1-4, p.150-155, 2006.
- Sakai, M.; Kamiya, H.; Ishii, S.; Atsuta, S. & Kobayashi, M. The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Diseases in Asian. *Aquaculture*, Amsterdam, v.1, p.413-417, 1992.
- Sakai, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, Amsterdam, v.172, n.1-2, p.63-92, 1999.
- Tinman, S.; Belotsky, S.; Avidar, Y.; Bogin, E. & Bejerano, I. Effect of long-term oral administration of peptidoglycan (PG- Ajinomoto product) on growth rate and immunostimulant response of hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* X *O. niloticus*), p 524-532, in *Proceedings of The 5th International Symposium On Tilapia Aquaculture*, 9, Rio de Janeiro, 2000.
- Vadstein, O. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*, Amsterdam, v.155, n.1-4, p.401-417, 1997.