



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

**DESEMPENHO DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO,
Litopenaeus vannamei, INFECTADO COM O VÍRUS DA MIONECROSE
INFECCIOSA (IMNV) E ALIMENTADO COM RAÇÕES CONTENDO UMA
COMBINAÇÃO DE β -1,3/1,6-GLUCANO E ÁCIDO L-ASCÓRBICO
MONOFOSFATADO**

LEANDRO FONSECA CASTRO

**TRABALHO SUPERVISIONADO (MONOGRAFIA)
APRESENTADO AO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
DE PESCA DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO PARTE DAS
EXIGÊNCIAS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
ENGENHEIRO DE PESCA.**

**FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL
DEZEMBRO/2007**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Alberto J. P. Nunes, PhD
Orientador

Prof. Marcelo Vinícius do Carmo e Sá, D.Sc
Presidente

Profa. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira
Membro

Eng. De Pesca Francisca Gleire Rodrigues de Menezes
Membro

VISTO:

Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C351d Castro, Leandro Fonseca.

Desempenho do camarão branco do pacífico, *Litopenaeus vannamei*, infectado com o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e alimentado com rações contendo uma combinação de f3-1,3/1,6-glucano e ácido l-ascórbico monofosfatado / Leandro Fonseca Castro. – 2017.
30 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Aberto J. P. Nunes.

1. Camarão (Crustáceo) - Criação. 2. Camarão (Crustáceo) - Mionecrose Infecciosa. 3. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

A minha mãe Mirtes, ao meu pai Ivan,
aos meus irmãos Gabriella e Wesley
e ao meu sobrinho Filipe.

“Para muitos o chão é o fim, para nós apenas o início”
Desconhecido.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada disso poderia ter acontecido.

Agradeço ao Professor Alberto Nunes, pelo apoio intelectual dado a mim durante todo esse período de estágio no laboratório.

A minha mãe “Dona” Mirtes, onde sempre me apoiou em todos os momentos de dificuldades, acreditando em mim, mesmo quando nem eu acreditava.

Ao meu pai Ivan, que mesmo longe espero que tenha orgulho de mim.

A todos do laboratório (Hassan, Antônio Carlos, Josiran, Josivania, Sandra, Silvio, Esaú).

A todos os meus colegas de curso.

SUMÁRIO

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
SUMARIO	v
RESUMO	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivo Específico.....	4
3. METODOLOGIA	5
3.1 Local do Estudo.....	5
3.2 Sistema de Cultivo.....	5
3.3 Limpeza e desinfecção do sistema de cultivo.....	6
3.4 Captura e Transportes dos Camarões.....	7
3.5 Desenho Experimental.....	7
3.6 Monitoramento do Cultivo.....	11
3.7 Histopatologia e PCR.....	12
3.8 Contagem de Hemócitos.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1 Condição Patológica e Desempenho Zootécnico.....	13
4.2 Avaliação Imunológica.....	16
5. CONCLUSÃO	18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

RESUMO

O Nordeste brasileiro possui inúmeras fazendas de cultivo de camarões onde, nos últimos anos, tiveram diversas perdas econômicas devido ao desenvolvimento de uma doença. Doença esta conhecida como Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). Possuindo um sistema imunológico inato, ou seja, sem memória adaptativa, os camarões apresentam uma resposta de defesa menos complexa perante as enfermidades. Como o uso de vacinas são ineficazes no sistema imunológico dos crustáceos, os imunostimulantes podem ser uma saída para obtenção de uma defesa mais ativa a organismos patogênicos que por ventura possam invadir o organismo dos camarões, servindo de alerta ao sistema imunológico desses animais. O presente estudo teve como objetivo verificar a eficácia do uso de β -1,3-glucano e dosagens elevadas de ácido L-ascórbico sobre o desempenho do camarão *L. vannamei* infectado com o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), além de quantificar o seu efeito em combinação com o ácido ascórbico no desempenho zootécnico dos camarões ao vírus. Foram utilizados 25 tanques de 500L cada, com filtragem mecânica e aeração constante. Cada tanque foi povoado com uma densidade de 96 animais/m², ou seja, 55 camarões por tanque, com peso de $1,20 \pm 0,63$ g (média \pm desvio padrão; $n = 50$) de animais que apresentavam sinais característicos da doença na fazenda, e cultivados por 36 dias. Utilizamos três tratamentos e dois controles. Um dos controles foi a ração comercial Camaronina hp 35 (**Ref**), e todas as outras rações foram fabricadas em laboratório. A ração **CT-01** foi o outro controle tendo quantidades normais de vitamina C e sem a presença de β -1,3-glucano. As outras rações foram os tratamentos denominados da seguinte forma: **T-01** (1000mg/Kg de vitamina C e sem β -1,3-glucano); **T-02** (1000mg/Kg de vitamina C e 600mg/Kg β -1,3-glucano) e **T-03** (sem vitamina C e 600mg/Kg de β -1,3-glucano). O tratamento que obteve a maior sobrevivência (**T-02**), também obteve a maior contagem total de hemócitos (THC), que foi utilizado como parâmetro imunológico. Demonstrando nesse estudo que a utilização isolada do β -1,3/1,6-glucano

ou da grande quantidade de ácido L-ascórbico, não obteve resultados tão satisfatórios quando utilizado os dois combinados.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Laboratório de Nutrição de Camarão (LNC) do Labomar e sistema de cultivo empregado no presente estudo.....	6
Figura 2. Captura e transporte de juvenis do camarão <i>L. vannamei</i> utilizado no estudo.....	7
Figura 3. Distribuição dos tanques de cultivo e seus tratamentos.....	9
Figura 4. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água....	11
Figura 5. Ganho de peso quinzenal do camarão <i>L. vannamei</i> ao longo do estudo. Letras iguais nas colunas indicam diferença estatística não significativa ao nível de $\alpha = 0,05$ segundo o teste <i>a posteriori</i> de Scheffé. Ref , Camaronina 35 hp; CT-01 , ração controle sem inclusão de β -1,3/1,6-glucano e 250 mg/kg de ácido L-ascórbico; T-01 , ração sem inclusão de β -1,3/1,6-glucano e com 1.000 mg/kg de ácido L-ascórbico; T-02 , ração com 600 mg/kg de β -1,3/1,6-glucano e 1.000 mg/kg de ácido L-ascórbico; T-03 , ração com 250 mg/kg de ácido L-ascórbico e 600 mg/kg de β -1,3/1,6-glucano.....	15
Figura 6. Gráfico mostrando a contagem total de hemócitos (THC), dos tratamentos ofertados com as diferentes Rações.....	17

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Detalhamento do delineamento experimental do estudo. A ração comercial Camaronina 35 hp foi fornecida integralmente no controle <i>Ref.</i>	8
Tabela 2. Tabela de arraçamento adotada no experimento, desenvolvido segundo taxas de alimentação NUNES & PARSONS (2000).....	10
Tabela 3. Resultados de desempenho zootécnico do camarão <i>L. vannamei</i> alimentado com rações ausentes ou presentes de β -1,3/1,6-glucano e doses elevadas de ácido L-ascórbico. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão obtidos de cinco tanques de cultivo.....	16

DESEMPENHO DO CAMARÃO BRANCO DO PACÍFICO, *Litopenaeus vannamei*, INFECTADO COM O VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV) E ALIMENTADO COM RAÇÕES CONTENDO UMA COMBINAÇÃO DE β -1,3/1,6-GLUCANO E ÁCIDO L-ASCÓRBICO

Leandro Fonseca Castro

1. INTRODUÇÃO

Desde o final de 2002 que um novo agente patogênico denominado de Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) vem causando significativas perdas econômicas em fazendas de engorda do camarão *Litopenaeus vannamei* na Região Nordeste do Brasil. Somente em 2003, estima-se que os prejuízos diretos advindos da perda de produção nos Estados afetados alcançaram US\$ 20 milhões (NUNES et al., 2004). A confirmação da origem viral da etiologia foi feita em fevereiro de 2004 por pesquisadores da Universidade do Arizona, após bioensaios de infectividade e estudos de microscopia eletrônica e análise genômica do vírus (LIGHTNER et al., 2004).

A primeira enfermidade viral em uma espécie cultivada de peneídeo foi descrita em 1974 (*Baculovirus penaei* ou BP; COUCH, 1974 a, b). Treze anos depois, no ano de 1987 em Taiwan, a indústria de cultivo de camarão sofreu o primeiro colapso na produção ocasionado por um vírus (LIGHTNER et al., 1987; LIN, 1989). A ocorrência de pandemias de origem viral se acentuou na última década gerando profundos impactos de caráter social e econômico em países em desenvolvimento (LIGHTNER, 2003). Rosenberry (2001) estimou que em 2000 somente o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) gerou perdas na produção mundial de camarão em cativeiro da ordem de 200.000 toneladas, um prejuízo estimado em US\$ 1 bilhão. Como conseqüência, o estudo das patologias e imunologia dos camarões peneídeos tornou-se uma prioridade a nível mundial.

Ao contrário dos vertebrados, os camarões não possuem um sistema imunológico com memória adaptativa. Os animais possuem, no entanto um sistema imune inato, apresentam respostas de defesa menos

complexas. Um componente essencial da imunidade dos camarões peneídeos inclui um mecanismo de vigilância capaz de detectar invasores ou a presença de células não-próprias. Este sistema de reconhecimento denominado de ProPo (pro-fenoloxidase) estimula respostas de defesa, incluindo aquelas mediadas por células. Proteínas aglutinantes do sistema imunológico dos camarões, tais como lipossacarídeos e β -1,3-glucanos, são capazes de reconhecer componentes da parede celular de bactérias e fungos (VARGAS-ALBORES; YEPIZ-PLASCENCIA, 2000). Apesar destas proteínas de reconhecimento serem incapazes de destruir os invasores, estes compostos são capazes de ativar funções celulares de defesa, como a fagocitose, melanização, encapsulação e coagulação.

A condição nutricional é considerada um dos mais importantes fatores para determinar a capacidade de resistência de qualquer animal frente a infecções. Na prática, as fazendas de engorda de camarão respondem a ação das enfermidades tentando manter uma boa condição ambiental nos viveiros de cultivo, e em alguns casos com a administração de dietas medicadas. O uso de imunoestimulantes e diversos tipos de aditivos na ração (carotenóides, farinha de algas, vitaminas E, C, etc.) é ainda pouco difundido no Brasil, em função da falta de informações relativas a sua forma de uso e eficácia.

Devido às particularidades do sistema imunológico dos peneídeos, os compostos biológicos denominados de imunoestimulantes, são os que têm apresentado melhor perspectiva de incrementar a resistência dos camarões frente a epizootias de origem viral. Os imunoestimulantes funcionam como alarmes das moléculas que ativam o sistema imunológico dos camarões. Em particular os β -1,3-glucanos podem amplificar estes estímulos contra infecções virais e bacterianas (VARGAS-ALBORES et al., 1996). Itami et al. (1998) reportaram que a administração de um peptidoglicano (β -1,3-glucanos) aumentou a resistência do camarão *Marsupeneus japonicus* exposto a vibriose. Sung et al. (1998) utilizando um β -1,3/1,6-glucano demonstraram um aumento na resistência do *Penaeus monodon* frente a vibriose e a infecção do vírus da Mancha Branca. Os camarões exibiram um crescimento mais rápido, uma redução

na mortalidade e uma melhor utilização do alimento. Chang et al. (2000) relatou que a atividade fagocítica dos hemócitos do camarão *P. monodon* é incrementada quando β -1,3-glucanos é adicionado a dieta.

A vitamina C também possui um papel importante na condição de saúde dos camarões atuando como um antioxidante, através da inativação de radicais livres produzidos pela atividade celular e por diversos estressores. A vitamina C é um nutriente essencial para os camarões peneídeos (GUARY et al., 1976), sendo indispensável para um crescimento normal do animal. Em camarões, a deficiência de vitamina C causa a Síndrome da Morte Negra (LIGHTNER et al., 1977, 1979), muda incompleta (CHEN; CHANG, 1994), aumento no fator de conversão alimentar e diminuição da resistência ao estresse (MAGARELLI et al., 1979). Os requerimentos de ácido L-ascórbico dos camarões peneídeos variam de 50 a 100 mg/kg de dieta (CUZON et al., 2004). Min-Hsien; Shi-Yen (2002) reportaram que o ácido ascórbico favoreceu a resposta imunológica do camarão *Penaeus monodon*. López et al. (2003) reportaram um efeito positivo no crescimento de camarões juvenis da espécie *L. vannamei* alimentados continuamente com uma dieta contendo β -1,3-glucano e vitamina C.

Com base nestes estudos, e pelo fato das vacinas não serem eficazes para uso em crustáceos, é de grande importância pesquisas que objetivem incrementar o status nutricional e a condição imunológica do camarão cultivado *Litopenaeus vannamei* frente a doenças virais.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Verificar a eficácia no uso de β -1,3-glucano e dosagens elevadas de ácido L-ascórbico sobre o desempenho do camarão *L. vannamei* infectado com o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV).

2.2 *Objetivos Específicos*

1. Quantificar o efeito do uso de ácido L-ascórbico em combinação com um β -1,3/1,6-glucano no desempenho zootécnico (crescimento, fator de conversão alimentar, sobrevivência) do camarão *L. vannamei* frente ao IMNV.
2. Determinar a eficácia de dosagens elevadas de ácido L-ascórbico em combinação com um β -1,3/1,6-glucano na condição imunológica do camarão *L. vannamei* frente ao vírus IMNV.

3. METODOLOGIA

3.1 Local do Estudo

O presente trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Nutrição de Camarão Marinho (LRNCM) do Instituto de Ciências do Mar (Labomar) da Universidade Federal do Ceará (UFC), situado no Centro de Estudos Ambientais Costeiros (CEAC) no Eusébio, Estado do Ceará (Figura 1), próximo ao Estuário do Rio Pacoti.

3.2 Sistema de Cultivo

Foram utilizados 25 tanques organizados em cinco células experimentais de cinco unidades cada, onde cada célula recebeu um tratamento experimental diferente (Figura 1). Os tanques empregados são de volume individual de 500 L e área operacional de 0,57 m². Por serem montados em células individuais, os tanques de cada célula foram interligados por meio de conexão de PVC com um diâmetro de 50 mm. A filtração mecânica de cada célula ocorreu de forma independente, onde se utilizava um filtro mecânico de areia de alta vazão (Dancor S.A Indústria Mecânica, Rio de Janeiro, RJ), conectado a uma eletro bomba de serviço contínuo (WEG Indústrias S.A., Guarulhos, SP). A água de cultivo foi aerada constantemente por três compressores radiais (Ibram Indústria Brasileira de Máquinas e Equipamentos, São Paulo, SP). Cada tanque dispunha de duas saídas de aeração das quais, saíam mangueiras de silicone (4 mm de espessura) e na sua extremidade eram colocadas pedra porosas com objetivo de facilitar a inserção do oxigênio na água.



Figura 1. Laboratório de Ração e Nutrição de Camarões Marinhos (LRNCM) do Labomar e sistema de cultivo empregado no presente estudo.

3.3 Limpeza e desinfecção do sistema de cultivo

Todo o sistema de cultivo (tanques, bandejas, canos e sistema de filtragem) foi lavado com água doce e desinfetado com hipoclorito de cálcio seco com 65% de produto ativo (cloro granulado HTH, Nordesclor S/A, Igarassu, PE). Logo após o contato do sistema com o cloro, esperou-se um período para a ação do produto e sua evaporação.

Os tanques foram lavados com água doce contendo 100ppm de hipoclorito de sódio para a desinfecção. O sistema de filtragem foi desmontado, tendo então a areia interna lavada e exposta ao sol durante certo período. Depois disso, o sistema de filtragem foi montado e conectado na célula de cultivo. Os tanques foram preenchidos com água doce contendo 200ppm de hipoclorito e então o sistema foi posto para funcionar. Passado esse período, o sistema foi drenado e colocado água salgada contendo 20ppm de hipoclorito de sódio. Com a circulação de água e aeração constante, o cloro residual contido na água dos tanques foi perdido para o meio, deixando-a própria para o cultivo.

2.2. Captura e Transporte das Acharnias

Os animais foram coletados em uma fazenda situada no distrito de São João do Cariri, no município de Monteiro, Paraíba, com população com 6.000 cabeças de caprinos, em um total de 1.000 indivíduos, com peso de 1,20 x 2,00 x 0,05 m e idade \pm 30 dias, $n = 30$. Os animais foram transportados em vans com capacidade máxima de 30 L. Os animais foram checados em um 20% de álcool 70% para evitar contaminação de laboratório, sendo a mais proximidade com o corpo por transporte em sacos plásticos, as nectários separados foram coletados imediatamente nos locais de coleta utilizando 30 sacos plásticos e refrigerados.

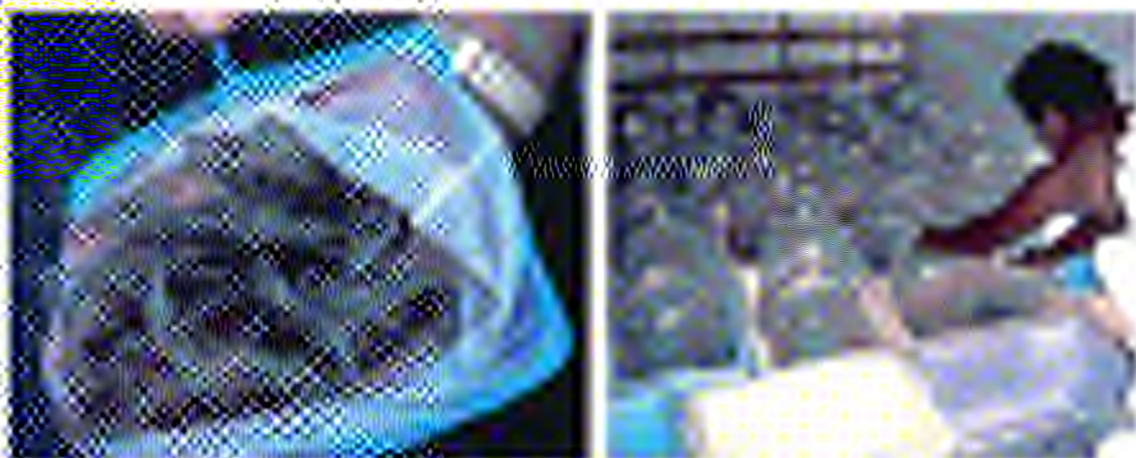


Figura 2. Coleta e transporte de joazeiro do cariri (L), nectários coletados (R).

2.3. Dieta Experimental

Os animais foram alimentados de três maneiras e duas condições. Nos experimentos de nectários, foram alimentados com uma dieta experimental baseada em capim e nectários de joazeiro, contendo com joazeiro normal (50 mg/kg) e com joazeiro com Lactobacillus (Tabela 1). O ácido fólico (FOLICIN[®] (A₁₁, J&B/MS) foi fornecido pela empresa Udo (Folicin[®] Udo (Folicin[®] Day-C[®] 20L, ácido fólico e 5-L-1,2-diguanosil sulfolato de sódio da empresa Biota Animal Health and Nutrition All products) (1 Microgram[®] a um polissacarídeo amido, a purina e parte

da parede celular da levedura de padeiro *Saccharomyces cerevisiae* (RAA, 2000, 2003). O MacroGard[®] possui 60% de β -1,3/1,6-glucano purificado.

O controle (**CT-01**) consistiu de camarões alimentados com doses normais de ácido L-ascórbico (250 mg/kg) e sem exposição ao MacroGard[®]. Um outro controle denominado de **Ref** consistiu de animais alimentados com uma ração comercial (Camaronina 35 hp, Cargill Nutrição Animal Ltda., São Lourenço da Mata, PE) durante todo ciclo.

Tabela 1. Detalhamento do delineamento experimental do estudo. A ração comercial Camaronina 35 hp foi fornecida integralmente no controle *Ref*.

	Ácido L-ascórbico	
β -1,3/1,6-glucano	1.000 mg/kg	Normal ¹
Ausente	T-01	CT-01
Presente ²	T-02	T-03

¹Normal indica uma dose de 250 mg/kg de ácido L-ascórbico para atender os requerimentos nutricionais da espécie.

²Indica uma dose de 600 mg de β -1,3/1,6-glucano em cada quilo de ração.

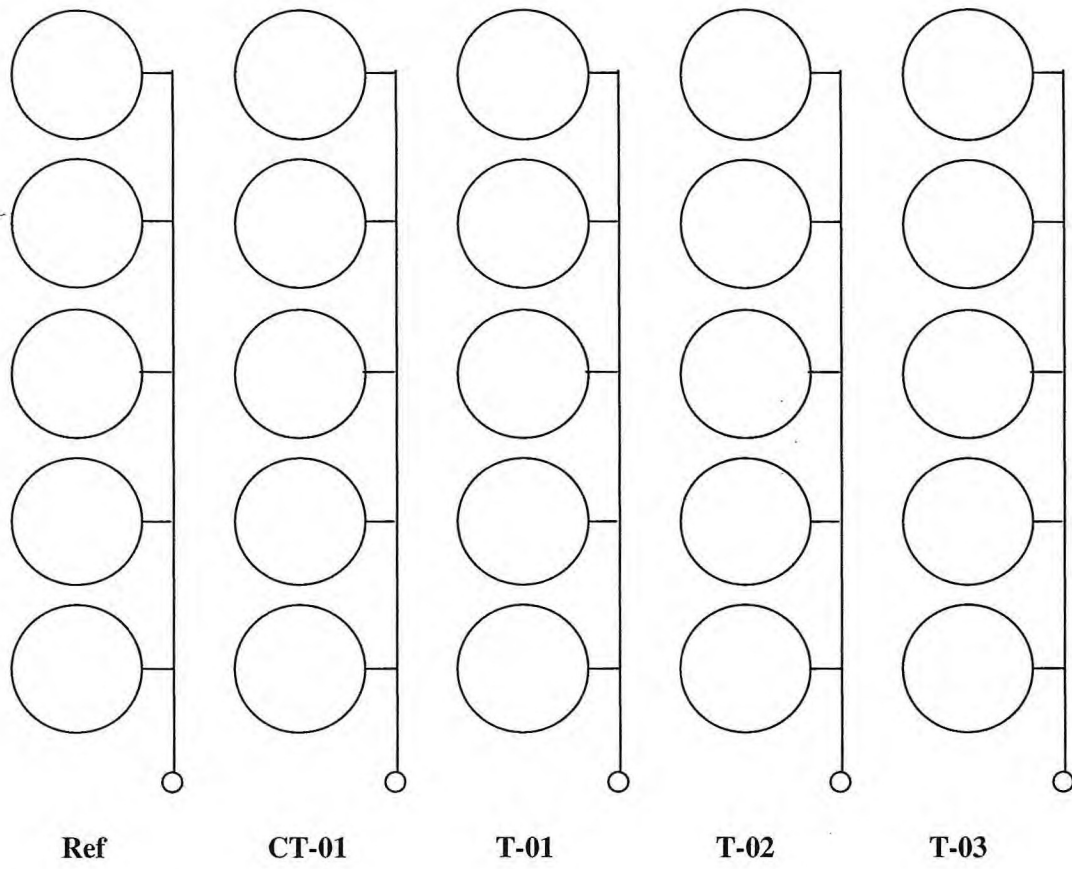


Figura 3. Distribuição dos tanques de cultivo e seus tratamentos.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, às 07:30 h e 13:30 h, exceto aos domingos. As rações experimentais foram fornecidas apenas na segunda refeição do dia, sendo que na primeira, todos os animais foram alimentados com a ração comercial Camaronina 35 hp. Toda ração foi fornecida em bandejas de alimentação. Durante a alimentação, a ração foi dispensada em um cano de PVC com 40 mm de diâmetro e 1 m de altura, direcionada para o centro da bandeja repousada no fundo do tanque. Após duas horas e meia de imersão em água, todo alimento não consumido foi coletado, pesado e descartado. As refeições seguiram as taxas de alimentação de acordo com Nunes; Parsons (2000) (tabela 2), ajustadas para cada tanque a cada 14 dias.

Tabela 2. Tabela de arraçamento adotada no experimento, desenvolvido segundo taxas de alimentação Nunes; Parsons (2000).

Peso Corporal		
Inicial (g)	Final (g)	Taxa Alimentar (%) ¹
1,0	1,9	8,0
2,0	2,9	7,5
3,0	3,9	6,5
4,0	4,9	6,0
5,0	5,9	5,5
6,0	6,9	5,0
7,0	7,9	4,5
8,0	8,9	4,0
9,0	9,9	3,5
10,0	10,9	3,0
11,0	11,9	2,5
12,0	12,9	2,0

¹ refere-se ao percentual de ração a ser adotada em relação à biomassa estocada de camarões (população estimada x peso médio populacional)

3.6 Monitoramento do Cultivo

As biometrias dos camarões foram realizadas a cada 14 dias, sempre aos domingos, onde se capturava, com puçás, 25% da população estocada (14 animais). Antecedendo a pesagem em balança eletrônica de precisão, os animais foram individualmente secos em papel toalha, pesados e retornados aos seus respectivos tanques. Para o controle da sobrevivência dos camarões, foi realizada a cada dia uma contagem visual nos tanques para detectar a presença de animais mortos ou moribundos. Na despesca, todos os animais foram contados e pesados.

As análises físico-químicas da água foram conduzidas diariamente, sempre no turno da tarde, às 15:00 h, exceto aos domingos. Foram avaliados a salinidade, o pH e a temperatura da água de todos os tanques do presente estudo (Figura 4). Quando detectado um processo de diminuição dos níveis de qualidade de água, a água de cultivo era parcialmente descartada através da retro lavagem dos filtros, adicionando-se água previamente desinfetada com hipoclorito de cálcio a 10 ppm e neutralizada com aeração, com uma salinidade de 35‰.

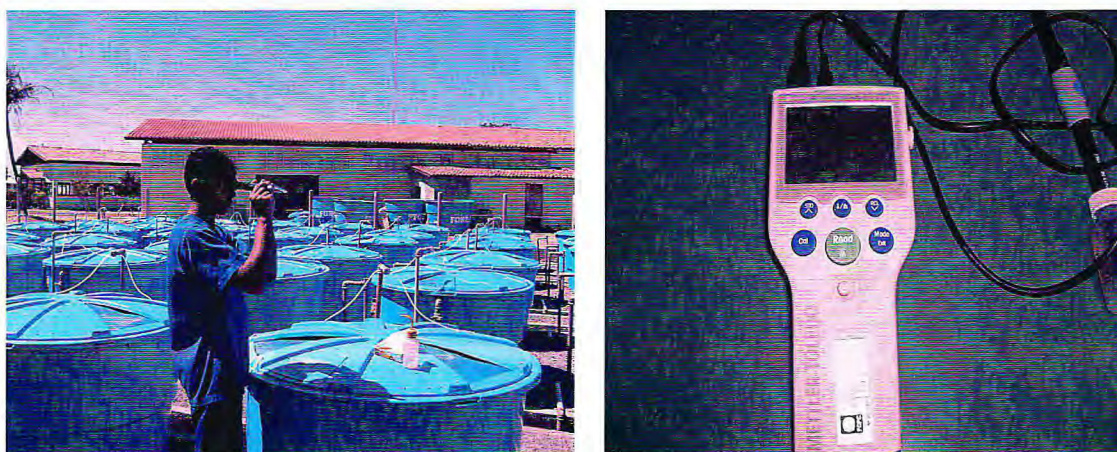


Figura 4. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água.

3.7 Histopatologia e PCR

Logo após a estocagem dos animais nos tanques de cultivo, um total de 10 animais foi coletado para análise histopatológica. Os camarões foram selecionados aleatoriamente e fixados utilizando uma solução de Davidson por 24 h. Cortes de 4 μ m foram corados pelo método Hematoxilina – Eosina, e analisados em microscópio de luz. Simultaneamente, um total de 30 animais foram coletados para análise de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Para esta análise, foi removido o segundo par de pereiópodos dos animais coletados, fixado em etanol 95% e encaminhado para a Universidade do Arizona para análise das doenças virais IHHNV, IMNV, WSSV e Taura.

3.8 Contagem de Hemócitos

A contagem total de hemócitos foi utilizada como parâmetro imunológico. No final do experimento foi coletado um camarão de cada tanque por tratamento, num total de cinco camarões por tratamento, no qual foi extraído hemolinfa de cada camarão e armazenada em um vidro de coleta, com uma solução anticoagulante na proporção de 8/1. Para cada tratamento foram feitos três “pools” diferentes, num total de dezoito “pools” de amostras. As amostras coletadas foram armazenadas em geladeira com temperatura de 4°C. Os hemócitos foram contados em câmara de Neubauer, na mesma metodologia da contagem de glóbulos brancos descrita por Moura et al. (2003). O número de células contados na câmara foi multiplicado pelo fator de correção 10, multiplicado pelo número de diluições (8), sendo o resultado reportado em células por mL (cels./mL).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condição Patológica e Desempenho Zootécnico

Análises histopatológicas de cinco dos dez indivíduos analisados apresentaram sintomas da Mionecrose Infecciosa (IMNV) em Grau 1. O hepatopâncreas de seis camarões investigados estava com alterações compatíveis com forte vibriose, mostrando áreas destruídas e processo inflamatório com presença de hemócitos. Análises de PCR foram positivas para IHNV, e negativa para os vírus WSSV, Taura e IMNV. Este último, o laudo de PCR foi contraditório em relação a análise histopatológica e aos sinais clínicos observados durante o cultivo, compatíveis com o IMNV. O laudo de PCR é influenciado pelo nível de infecção da amostra coletada (NAVARRO, 2006). Os pleópodos coletados para análise, podem ter apresentado um grau de infecção abaixo do nível de detecção do PCR.

Os camarões cresceram lentamente ao longo de todo estudo, compatível com o crescimento semanal de outros estudos feitos em condições controladas semelhantes (NUNES et al., 2006). O ganho de peso entre os tratamentos apresentaram-se estatisticamente diferentes ($P < 0,05$, Figura 5) a partir do 28º dia de exposição às rações experimentais. Na despesca, os animais alimentados com as rações **CT-01** e **T-03** exibiram peso médio estatisticamente superior aos demais tratamentos. Estes resultados não são compatíveis com os observados por Lopez et al. (2003). Os autores observaram taxas de crescimento mais elevadas para grupos do *L. vannamei* alimentados com uma combinação de β -1-3 glucano e vitamina C.

O crescimento dos camarões foi influenciado diretamente pela sobrevivência. Tratamentos que obtiveram peso corporal maior foram os que tinham menor sobrevivência. Nos tratamentos **CT-01** e **T-03**, mostraram sobrevivência de $41,1\% \pm 0,09$ e $47,6\% \pm 0,10$ respectivamente. Tratamentos estes que atingiram maiores taxas de crescimentos semanais e peso final. A relação inversa entre números de indivíduos estocados e crescimento é evidenciada em diversos trabalhos (RAY ; CHIEN 1992; SANDIFER et al., 1998).

Em muitos estudos o efeito do betaglucano é contraditório. Alguns relatam não terem encontrado nenhum efeito sobre o crescimento (SONG et al., 1997), outros mostram um efeito positivo (LOPEZ, 2003). No caso desse trabalho o tratamento que obteve maior taxa de crescimento semanal foi o **T-03** onde este utilizou betaglucano sem doses elevadas de vitamina C.

No presente estudo, as rações com β -1,3/1,6-glucano e (ou) ácido L-ascórbico apresentaram um efeito mais evidente sobre a sobrevivência dos camarões (Tabela 3). Os tratamentos **CT-01** e **T-03** exibiram, apresentou uma menor sobrevivência em relação aos demais. Especificamente, a combinação de β -1,3/1,6-glucano e ácido L-ascórbico (**T-02**) em uma inclusão de 1.000 mg/kg resultou em uma maior sobrevivência dos animais cultivados. Os tratamentos que continham individualmente β -1,3/1,6-glucano ou ácido L-ascórbico (**T-01** e **T-03**) não apresentou sobrevivência superior ao tratamento **T-02**.

Chang et al. (2000) em um estudo com *Penaeus monodon* alimentados com rações contendo betaglucanos resultaram em maior sobrevivência comparada ao grupo controle. Nesse estudo, o uso isolado do β -1,3/1,6-glucano demonstrou uma menor sobrevivência quando comparado com os testes **T-01** e **T-02** que utilizaram diferentes combinações de glucano e vitamina C. No tratamento que utilizou a combinação destes dois produtos (**T-02**), apresentou a maior sobrevivência.

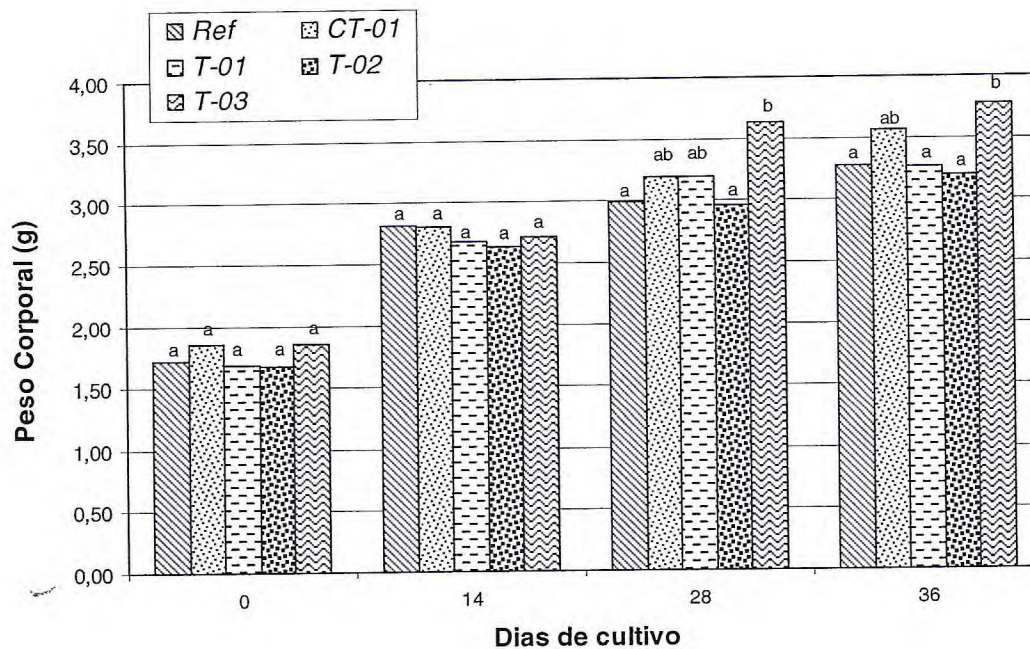


Figura 5. Ganho de peso quinzenal do camarão *L. vannamei* ao longo do estudo. Letras iguais nas colunas indicam diferença estatística não significativa ao nível de $\alpha = 0,05$ segundo o teste *a posteriori* de Scheffé. **Ref**, Camaronina 35 hp; **CT-01**, ração controle sem inclusão de β -1,3/1,6-glucano e 250 mg/kg de ácido L-ascórbico; **T-01**, ração sem inclusão de β -1,3/1,6-glucano e com 1.000 mg/kg de ácido L-ascórbico; **T-02**, ração com 600 mg/kg de β -1,3/1,6-glucano e 1.000 mg/kg de ácido L-ascórbico; **T-03**, ração com 250 mg/kg de ácido L-ascórbico e 600 mg/kg de β -1,3/1,6-glucano.

Tabela 3. Resultados de desempenho zootécnico do camarão *L. vannamei* alimentado com rações ausentes ou presentes de β -1,3/1,6-glucano e doses elevadas de ácido L-ascórbico. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão obtidos de cinco tanques de cultivo.

Ração*	Sobrevivência (%)	Crescimento (g/semana)	Peso Final (g)
Ref	38,5% \pm 0,10	0,30 \pm 0,04	3,27 \pm 0,17
CT-01	41,1% \pm 0,09	0,34 \pm 0,07	3,58 \pm 0,28
T-01	53,1% \pm 0,04	0,31 \pm 0,02	3,25 \pm 0,17
T-02	61,5% \pm 0,03	0,30 \pm 0,05	3,19 \pm 0,12
T-03	47,6% \pm 0,10	0,39 \pm 0,09	3,85 \pm 0,54

***Ref**, Camaronina 35 hp; **CT-01**, ração controle sem inclusão de β -1,3/1,6-glucano e 250 mg/kg de ácido L-ascórbico; **T-01**, ração sem inclusão de β -1,3/1,6-glucano e com 1.000 mg/kg de ácido L-ascórbico; **T-02**, ração com 600 mg/kg de β -1,3/1,6-glucano e 1.000 mg/kg de ácido L-ascórbico; **T-03**, ração com 250 mg/kg de ácido L-ascórbico e 600 mg/kg de β -1,3/1,6-glucano

4.2 Avaliação Imunológica

A avaliação da condição imunológica dos camarões cultivados no momento da despesca através da contagem total de hemócitos reforçou os resultados zootécnicos observados (Figura 6).

Maggioni et al. (2004) trabalhando com *Litopenaeus vannamei*, alimentado com ração em combinação com alimento fresco contendo alta dosagem de vitamina C, não encontraram diferenças estatisticamente significativa na contagem total de hemócitos. Nesse trabalho, o tratamento que continha dosagem elevada de ácido L-ascórbico também não mostrou ser promissor em aumentar a quantidade total de hemócitos (THC). Em um trabalho de Chang et al. (2003), *P. monodon* foi infectado com WSSV e alimentados com betaglucanos, não encontraram um aumento significativo em seu THC. Em acordo com esse trabalho, o tratamento **T-03** que tinha doses normais de vitamina C e presença de betaglucano, também não obteve uma quantidade grande de hemócitos.

Os camarões submetidos ao tratamento **T-02** exibiram uma maior contagem de hemócitos quando comparados aos demais tratamentos. Isto evidenciou o efeito da combinação do β -1,3/1,6-glucano e do ácido L-ascórbico na condição imunológica dos animais. Novamente, a inclusão individual do β -

1,3/1,6-glucano ou do ácido L-ascórbico não demonstrou um efeito tão positivo quando comparado ao uso combinado.

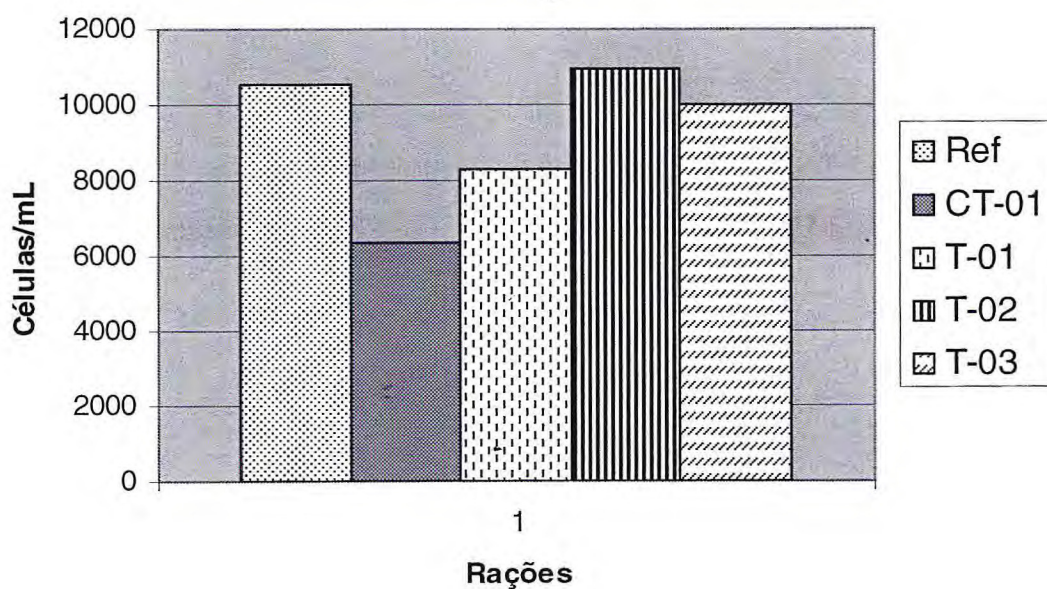


Figura 6. Gráfico mostrando a contagem total de hemócitos (THC), dos tratamentos ofertados com as diferentes rações.

5. CONCLUSÃO

Apesar do β -1,3/1,6-glucano demonstrar, através da avaliação imunológica (THC), que pode ser usado como ativador do sistema imunológico do *L. vannamei*, o presente estudo demonstrou que esse composto não obteve resultados tão favoráveis quando utilizado individualmente, sem o ácido L-ascórbico em altas dosagens (1.000 mg/kg). No que diz respeito ao crescimento dos animais, observou-se uma menor taxa de crescimento quando na ausência do β -1,3/1,6-glucano. É possível que a ativação das respostas imunológicas do animal drene mais energia, resultando em um menor crescimento dos animais. Estudos posteriores devem tentar relacionar uma quantidade ótima de ácido L-ascórbico, combinado com outros níveis de β -1,3/1,6-glucano usados no presente estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

CHENG, H.Y.; CHANG, C.F. Quantification of vitamin C requirements for juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) using polyphosphorylated L-ascorbic acid. **The journal of Nutrition**. v. 124, p. 2033-2038, 1994.

COUCH, J.A. An ezootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 24, p. 311-331, 1972a.

COUCH, J.A. Free and occluded virus similar to *Baculovirus* in hepatopancreas of pink shrimp. **Nature**, v.247, p. 229-331, 1974b.

CUZON, G.; LAWRENCE, A.; GAXIOLA, G.; ROSAS, C.; GUILLAUME, J. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, v. 235, p. 513-551, 2004.

GUARY, M.; KANAZAWA, A.; TANAKA, N.; CECCALDI, H.J. Nutritional requirements of prawn: VI. Requirement for ascorbic acid. **Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.**, v. 25. p. 53-57, 1976.

ITAMI, T.; ASANO, M.; TOKUSHIGE, K.; JUBONO, K.; NAKAGAWA, A.; TAKENO, N.; NISHIMURA, H.; MAEDA, M.; KONDO, M.; TAKAHASHI, Y.. Enhancement of disease resistance of karuma shrimp, *Penaeus japonicus*, after

oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. **Aquaculture**, v. 164, p. 277-288, 1998.

LIGHTNER, D. V.; COLVIN, L. B.; BRAND, C.; DONALD, D. A. 1977 Black death, a disease syndrome of Penaeid shrimp related to a dietary deficiency of ascorbic acid. **Proceedings of the World Aquaculture Mariculture Society**, v. 8, p. 611-623, 1977.

LIGHTNER, D. V.; HUNTER, B.; MARAGRELLI, P. C. Jr.; COLVIN L. B. Ascorbic acid: nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp. **Proceedings of the World Aquaculture Mariculture Society**, v. 10, p. 513-528, 1979.

LIGHTNER, D. V.; HERDRICK, R. P.; FRYER, J. L.; CHENG, S. N.; LIAO, I.C.; KOU, G. H. A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. **Fish Pathology**, v. 22, p. 127-140, 1987.

LIGHTNER, D. V. Exclusion of specific pathogens for shrimp diseases prevention, p. 81-116, in Lee, C. -H & O'Bryen, P. J. (eds.). Biosecurity in aquaculture production systems: Exclusion of pathogens and other undersirables. **The World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, EUA, v. 293 p. 81-116, 2003.

LIGHTNER, D.V.; PANTOJA, C.R.; POULOS, B.T.; TANG, K. F. J.; REDMAN, R. M.; ANDREAS, T.; BONAMI, J.R. 2004. Infectious Myonecrosis (IMN): a new virus disease of *Litopenaeus vannamei*. In: Book of Abstracts of Aquaculture 2004. **The World Aquaculture Society**, Honolulu, Havai, EUA, 2004.

LIN, C.K. What went wrong? **World Aquaculture**, v. 20, p. 19-20, 1989.

LÓPEZ, N.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; TABOADA, G.; VALENZUELA, M.; PASCUAL, C.; SANCHEZ, A.; ROSAS, C. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture**, v. 224, p. 223-243, 2003.

MAGARELLI, P. C. Jr.; HUNTER, B.; LIGHTNER, D. V.; COLVIN, L. B. Black death: an ascorbic acid deficiency disease in penaeid shrimp. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 63A, p. 103-108, 1979.

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

MIN-HSIEN, L.; SHI-YEN, S. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.12, p. 119-129, 2002.

MOURA, R. A.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T. V. **Técnicas de laboratório**. 3ª Edição. Rio de Janeiro. Atheneu, 2002, 511p.

NAVARRO, S. *Comunicação Pessoal*. University of Arizona, Veterinary Science/Microbiology. solangel@email.arizona.edu, 2006.

NUNES, A. J. P.; PARSONS, G. J. Size-related feeding and gastric evacuation measurements for the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis*. **Aquaculture**, v. 187, p. 133-151, 2000.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) no cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei* no Brasil. **Panorama da Aqüicultura**, v. 14, p. 37-51, 2004.

NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; CARVALHO, E. A.; SABRY-NETO, H. Growth performance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared under time- and rate- restriction feeding regimes in a controlled culture system. **Aquaculture**, v. 253, p. 646-652, 2006.

RAA, J. The use immune-stimulants in fish and shellfish feeds, in CRUZ-SUAREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLIVEIRA-NOVOA, M.; CIVERA-CRECEDO, R. (eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Mérida, Yucatán, México, p. 47-56, 2000.

RAA, J. Beta-1,3/1,6-glucanos: la ciência moderna y la sabiduida antigua se combinam em beneficio de la acuicultura. *Panorama Acuícola*. v. 8, p. 28-29, 2003.

RAY, W. M.; CHIEN, Y. H. Effects of stocking density and sediment on tiger prawn, *Penaeus monodon*, nursey sytems. *Aquaculture*, v. 104, p 231-248, 1992.

ROSENBERRY, B. World Shrimp Farming 2000. Shrimp News International. *Shrimp News International*, San Diego, California, EUA, n. 13, 2001.

SANDIFER, P. A.; HOPKINS, J. S.; STOKES, A. D. Intensification of shrimp culture in earthen ponds in South Carolina: progress and prospects. *Journal of the World Aquaculture Society*. v. 19, p. 218-226, 1988.

SONG, Y. L.; LIU, J. J.; CHAN, L. C.; Sung, H. H. Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Vaccinology*, v. 90, p. 413-421, 1997.

SUNG, H. H.; KOU, G. H.; SONG, Y. L. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*, v. 29, p. 11-17, 1998.

VARGAS-ALBORES, F.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture*, v. 191, p. 13-21, 2000.

VARGAS-ALBORES, F.; JIMENEZ-VEIA, G.; SODERHALLI, K. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus carliforniensis*) which enhances

the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 20, p. 299-306, 1996.