



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

USO DE UM POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA
ALGA MARINHA *Solieria filiformis* COMO
IMUNOESTIMULANTE NO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus*
vannamei.

Tarcísio Barbosa Lima Júnior

MONOGRAFIA APRESENTADA 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
FEVEREIRO/2006



COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof. Francisco Hiran Farias Costa, M.Sc.
Orientador**

**Prof. Wladimir Ronald Lobo Farias, D.Sc.
Co-Orientador**

**Eng. de Pesca Ítalo Régis Castelo Branco Rocha, M.Sc.
Membro**

VISTO

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

**Prof^a Artamízia Maria Nogueira Montezuma, M. Sc.
Coordenadora 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)

Lima Júnior, Tarcísio Barbosa.

Uso de um polissacarídeo sulfatado extraído da Alga Marinha Solieria filiformis como imunoestimulante no Camarão Marinho Litopenaeus vannamei / Tarcísio Barbosa Lima Júnior. – 2006.

44 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2006.

Orientação: Prof. Dr. Francisco Hiran Farias Costa.

1. Alga Marinha. 2. Camarão Marinho(Crustáceo). 3. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Tarciso Barbosa Lima e Raimunda Barros Barbosa, que tão bem souberam desempenhar a sua missão nobre como orientadores, conselheiros e amigos, o meu reconhecimento e a minha gratidão.

Quero fazer jus a todas as suas expectativas através de um bom desempenho na caminhada que ora inicio.

À minha esposa Vaneza,

Pela compreensão durante todas as etapas deste trabalho, e pela solidariedade e apoio que tive nos momentos de incerteza.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Francisco Hiran Farias Costa, pela dedicada orientação e pelo apoio na execução deste trabalho.

Ao professor e Co-Orientador Wladimir Ronald Lobo Farias e ao Engenheiro de Pesca Ítalo Régis Castelo Branco Rocha, pela participação na análise deste trabalho, como membros desta banca examinadora.

Aos professores Alexandre Holanda Sampaio e Silvana Saker Sampaio pelo apoio durante o processo da elaboração deste trabalho. Pessoas que admiro.

Ao amigo André Luiz Freitas de Souza, pelo interesse e dedicação com o qual acompanhou este trabalho durante minha ausência, bem como pela sincera amizade demonstrada no convívio.

Ao amigo Flávio José Ferreira da Silva, por suas sugestões e apoio em toda a minha vida acadêmica, onde nesta conquista existe certamente sua presença.

Aos amigos Camila Mendes Silva e José Fernandes da Silva Neto, pela amizade, companheirismo e apoio na realização deste trabalho.

A Engenheira de Pesca Grazielle da Costa Pontes do Laboratório de Bioquímica Marinha pela coleta da alga marinha *Solieria filiformis*, como também pela extração e incorporação do Polissacarídeo Sulfatado da mesma nas dietas-teste.

Aos meus irmãos, Ana Cláudia Barros Barbosa, Ana Célia Barros Barbosa e Augusto César Barros Barbosa, pela amizade e incentivo ao longo deste curso.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica Marinha, Eudismar V. Nunes e Ramon Feitosa Rodrigues, pela participação na execução deste trabalho.

A Dispa Indústria de Rações S.A FRI-RIBE por toda a confiança e apoio prestado.

Aos amigos de sala que de alguma forma puderam contribuir para o meu engrandecimento: Juca Roger, Alexandre Silva, Glauber César, Lílian Sales, Cláudia Brandão, Edirsana Maria, Kelma Pires, Ricardo Hugo, Lafaiete, Amilton Alves, Pedro Reis, Rosangela Santiago, Kelly Freitas, Carolina Nunes, Douglas Ferreira, Igor Pinho, Rafael Cavalcante.

A todos os professores, funcionários e estudantes do curso de Engenharia de Pesca, que de alguma forma contribuíram na execução deste trabalho.

E, por fim, eu seria um relapso se não mencionasse a mulher extraordinária que transformou a minha vida, minha esposa Vaneza, a mulher mais incrivelmente talentosa que já conheci.

SUMÁRIO

LISTAS DE TABELAS	viii
LISTAS DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAL E MÉTODOS	06
2.1. Coleta da alga e extração do Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de <i>Solieria filiformis</i>	06
2.2. Dietas-teste	09
2.3. Preparação do extrato viral	09
2.4. Efeito do Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) no crescimento e sobrevivência de juvenis de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> infectados com IMNV	11
2.5. Crescimento e sobrevivência	11
2.6. Coleta da hemolinfa e preparação do soro	12
2.7. Concentração de proteína no soro	12
2.8. Atividade hemaglutinante	12
2.9. Especificidade por açúcares	13
2.10. Análise estatística	13
3. RESULTADOS	14
3.1. Extração do Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de <i>Solieria filiformis</i>	14
3.2. Efeito do Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de <i>Solieria filiformis</i> sobre o crescimento e sobrevivência de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> infectados com IMNV	14

3.3. Efeito do Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) sobre o teor protéico e a atividade hemaglutinante na hemolinfa de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> infectado com IMNV	14
4. DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÕES	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTAS DE TABELAS

- Tabela 1:** Resultado da análise de variância sobre o ganho de peso de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV e alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis*. 16
- Tabela 2:** Resultado da análise de variância sobre a taxa de sobrevivência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV e alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis*. 17
- Tabela 3:** Ganho de peso, taxa de crescimento e sobrevivência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV e alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis*. 18
- Tabela 4:** Conteúdo de proteína e atividade hemaglutinante da hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV e alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis*. 20
- Tabela 5:** Inibição da atividade hemaglutinante na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV e alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis*. 21

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de extração de Polissacarídeos Sulfatados	7
Figura 2: Alga marinha <i>Solieria filiformis</i>	8
Figura 3: Rações com 4, 8 e 12 g de PSB/kg de dietas-teste.	10
Figura 4: Taxa de sobrevivência de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> infectados com IMNV e alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de <i>Solieria filiformis</i> . CI – Controle infectado; CNI – Controle não infectado.	19
Figura 5: Grau ZERO (G - 00), (Recomendações de Boas Práticas de Manejo na Prevenção de Enfermidades, ABCC, 2004).	25
Figura 6: Grau UM (G - 01), (Recomendações de Boas Práticas de Manejo na Prevenção de Enfermidades, ABCC, 2004).	26
Figura 7: Grau DOIS (G - 02), (Recomendações de Boas Práticas de Manejo na Prevenção de Enfermidades, ABCC, 2004).	27
Figura 8: Grau TRÊS (G - 03), (Recomendações de Boas Práticas de Manejo na Prevenção de Enfermidades, ABCC, 2004).	28
Figura 9: Grau QUATRO (G - 04), (Recomendações de Boas Práticas de Manejo na Prevenção de Enfermidades, ABCC, 2004).	29

RESUMO

Neste estudo, diferentes doses do extrato bruto do polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Solieria filiformis* foram usados na alimentação de camarões e o efeito de dietas com diferentes concentrações foi avaliado no intuito de se incrementar a sobrevivência em camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). A alga marinha *Solieria filiformis* foi coletada na Praia do Pacheco, Caucaia, Ceará, Brasil. O Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) foi obtido por digestão com papaína e estocado à temperatura ambiente para uso posterior. O PSB foi incorporado em 4 dietas teste isoprotéicas que foram produzidas pela DISPA Indústria de Rações S.A. (Maracanaú, Ceará, Brasil) e formuladas para conter 35% de proteína e 8% de lipídeos. Todas as dietas apresentaram a mesma composição exceto para o nível de PSB adicionado para conter 0, 4, 8 e 12 g.kg⁻¹ de dieta. Camarões infectados por IMNV coletados em fazendas comerciais foram homogeneizados em solução salina (1:1, v/v) a 4°C e utilizados em processos de contaminação de indivíduos aparentemente saudáveis. Um grupo de 200 camarões foi selecionado e dividido aleatoriamente em 5 subgrupos e cada subgrupo foi subdividido em 4 repetições. Dez juvenis para cada repetição foram estocados em um tanque de 40 L com água do mar e aeração constante. A renovação diária foi de 25%. As dietas testes foram ofertadas por 4 dias antes das alterações dos camarões. No 5.º dia, os camarões foram alterados por incubação da solução viral por 8 h com exceção para um controle não infectado (CNI). Esse concentrado viral causou mortalidade no controle infectado (CI) e nos tratamentos entre o 5.º e 8.º, após a infecção viral. As dietas testes foram ofertadas continuamente por mais 15 dias. A taxa de alimentação variou entre 5-7% do peso corpóreo e foi ajustada de acordo com a resposta alimentar dos camarões em cada tanque. Os resultados sugerem uma possível função antiviral do PSB da alga marinha *Solieria filiformis*, pois sua incorporação em dietas aumentou a resistência ao IMNV em camarões *Litopenaeus vannamei*.

**USO DE UM POLISSACARÍDEO SULFATADO EXTRAÍDO DA ALGA
MARINHA *Solieria filiformis* COMO IMUNOESTIMULANTE NO CAMARÃO
MARINHO *Litopenaeus vannamei*.**

Tarcísio Barbosa Lima Júnior

1 - INTRODUÇÃO

Durante as três últimas décadas, a aquicultura tem se expandido, diversificado, intensificado e tido avanços tecnológicos. O desenvolvimento desta atividade de reconhecido potencial é capaz de incrementar a produção de alimentos, reduzir a pobreza e melhorar a subsistência rural. A declaração de Bangkok enfatiza a necessidade do setor aquícola continuar a se desenvolver com potencial máximo, tendo uma contribuição líquida para a viabilização do alimento no mundo, da segurança alimentar doméstica, do crescimento econômico e do incremento dos padrões de vida de populações carentes (FAO, 2002a).

Segundo as estáticas da FAO, a contribuição da aquicultura para o suprimento global de peixes, crustáceos e moluscos tem apresentado crescimento contínuo, tendo tido um aumento na participação da produção mundial de pescado da ordem de 3,9% em 1970 para 27,3% em 2000 (FAO, 2002a), o que significa dizer que a aquicultura está crescendo mais rapidamente que todos os outros setores de produção animal.

Mundialmente, o setor tem crescido a uma taxa média composta de 9,2% ao ano desde 1970, comparado com somente 1,4% para as capturas de pescado e 2,8% para a pecuária. Em 2002, o volume de produção alcançou cifras de 39,8 milhões de toneladas, representando um faturamento de U\$ 53,8 bilhões (FAO, 2002b). O Brasil começa a despontar no cenário mundial, tendo no período entre 1998 e 2002, evoluído da 21.^a para a 17.^a posição.

O Brasil, tendo a região Nordeste como a principal área de produção, vem se consolidando no cenário mundial como um dos principais países exportadores de camarão marinho. Nos últimos 05 anos, as exportações brasileiras passaram de 4.800 toneladas (cerca de 5% do camarão exportado era oriundo da pesca) em 2003, representando um crescimento no período de aproximadamente 1.160%. Em 2003, as exportações brasileiras de camarão marinho alcançaram cerca de U\$ 244,5 milhões, sendo mais de 95% oriundos das fazendas de camarão marinho localizadas na região Nordeste do Brasil, conferindo-se, regionalmente, a este produto o segundo lugar na pauta de exportação de produtos agrícolas. O estado do Ceará despontou, no ano de 2003, como o principal exportador de camarão marinho do Brasil, gerando em divisas U\$ 80,9 milhões referentes às 20.100 toneladas exportadas.

Estes níveis de crescimento, obrigatoriamente associados ao aumento das áreas de cultivo e aos processos de intensificação, compromete a sustentabilidade ecológica das fazendas de camarão devido aos lançamentos de efluentes ricos em nutrientes nas águas costeiras, podendo resultar na deterioração da saúde dos ecossistemas, comprometendo a rentabilidade deste importante agronegócio (ENG et al. 1989; NAYLOR et al., 1998). Um outro problema crescente para a indústria do camarão marinho cultivado tem sido os problemas com doenças em muitos países da Ásia, da América Central e Latina. Grande parte dos problemas com doenças tem origem viral e é exacerbadas em ambientes com qualidade de água inferior, fazendas com altos níveis de intensificação, altas concentração de fazendas em um ambiente limitado e produção de efluentes (KAUTSKY et al., 2000). Por esse motivo principal, esta indústria, de forma contínua e crescente, é pressionada por órgãos ambientais e organizações não governamentais (ONGs), no sentido de reduzir as descargas de nutrientes e de sólidos suspensos, minimizando o efeito das enfermidades. Ações deste tipo poderiam tornar a atividade ainda mais viável e lucrativa, tornado a carcinicultura marinha ecologicamente correta.

Finalmente, para se continuar tendo um crescimento sustentável da indústria de camarões cultivados, reduzindo de forma aceitável os problemas com patógenos, é essencial entender que uma única ação ou estratégia não poderá

garantir uma solução e que, na realidade, um conjunto de técnicas serão necessárias, incluindo a manipulação do ambiente de cultivo (HAUTON et al., 2000), provavelmente, através da adoção do conceito de aqüicultura integrada, uso de probióticos como material de rotina durante os cultivos (GATESOUBE, 1999) e uso de imunostimulantes e outros compostos nas fases críticas de crescimento de camarões cultivados.

BROCK (1988) relatou a necrose muscular idiopática (IMN) no camarão da Malásia, *Macrobrachium rosenbergii*, caracterizando-a como doença de origem não infecciosa, associando a IMN ao estresse das condições de cultivo devido aos baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, extremos de temperatura ou salinidade.

No Nordeste do Brasil, principalmente nos estados do Piauí e Ceará, durante os períodos chuvosos dos anos de 2003 e 2004, tem se verificado uma forte incidência de IMNV em camarões cultivados *Litopenaeus vannamei*, resultando em baixos índices de sobrevivência em, praticamente, todas as fazendas, independentes das práticas de manejo, do nível de intensificação, fonte de pós-larvas e qualidade nutricional das rações. Estudos realizados por LIGHTNER et al. (2004) indicam que esta patologia tem natureza viral, tendo sido denominada de vírus da mionecrose infecciosa (infectious myonecrosis vírus – IMNV), apresentando o vírus um formato esférico com 40 nm, genoma de RNA e pertencendo a família Totiviridae.

Para a redução do estresse, a indústria do camarão tem utilizado antibióticos, imunostimulantes e diversos tipos de aditivos alimentares (carotenóides, algas em pó, *Spirulina*, vitamina E e vitamina C), objetivando ofertar uma dieta adequada para manter a sanidade dos camarões cultivados. Bacterioses podem ser controladas com antibióticos, mas o uso de antibióticos representa um perigo ambiental e a difusão de organismos resistentes aos antibióticos. Adicionalmente, o uso de antibióticos possui eficiência reduzida contra os vírus (ALDAY-SANZ et al., 1998).

Peptídeoglicanos, glucanos e lipopolissacarídeos são freqüentemente, preparados a partir da parede celular de fungos, leveduras ou bactérias não patogênicas (SUNG et al., 1994; BOONYARATPALIN et al., 1995; SUNG et al.,

1996; SONG et al., 1997; ITAMI et al, 1998; SCHOLZ et al., 1999; CHANG et al., 2000; TAKAHASHI et al. 2000).

Peptídeoglicanos são fragmentos obtidos da parede de organismos que conferem aos animais mais resistência às infecções microbianas, camarões marinhos cultivados alimentados com peptídeoglicanos respondem a uma imunestimulação da mesma forma que a uma agressão microbiana. O β -1-3-glucano tem sido utilizado com sucesso como imunestimulante para incrementar a resistência de camarões contra infecções virais ou bacterianas. Itami et al. (1998) reportaram que a administração de dieta de peptídeoglicanos (β -1-3-glucano) incrementa a resistência de *Marsupenaeus japonicus* contra vibrioses. Usando um glucano diferenciado, β -1-3-1-6-glucano, extraído da parede celular de leveduras, SUNG et al. (1998) demonstraram o incremento da resistência de *Penaeus monodon* contra a infecção por vibrioses e pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).

O uso de polissacarídeos sulfatados como ferramenta imunestimulante em estudos relacionados com o mecanismo de defesa de camarões marinhos cultivados é reduzido. Segundo SRITUNYALUCKSANA et al. (1999), a laminarina um polissacarídeo sulfatado encontrado na alga *Laminaria digitata*, em concentrações entre 0,4 e 0,8%, não foi capaz de ativar profenoloxidase de *Penaeus monodon* em ensaios *in vitro*.

O tratamento de juvenis de camarões *Litopenaeus vannamei* por imersão em uma solução contendo um polissacarídeo sulfatado, extraído da microalga cianofícea *Cyanotheca* sp, incrementou a produção de ânion superóxido e a atividade da enzima superóxidase dismutase tanto em hemócitos como no tecido muscular dos animais (CAMPA-CÓRDOVA et al., 2002).

A administração de fucoidana, um polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Sargassum polycystum*, foi capaz de reduzir substancialmente o impacto da infecção causada pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) em *P. monodon*. Segundo CHOTIGEAT et al. (2004), dez dias após a infecção contra o WSSV, camarões com peso entre 5-8 g e alimentados com 400 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo e camarões com peso entre 12-15 g e alimentados com 200 mg.kg⁻¹ de

peso corpóreo tiveram taxas de sobrevivência máximas de 46 e 93%, respectivamente. Neste sentido, o uso de substâncias imunoestimulantes na dieta representa perspectiva promissora como procedimento profilático, pois podem favorecer de alguma forma os mecanismos de defesa (SAKAI, 1999).

Especificamente para o estado do Ceará, apesar de um incremento da área de produção de 49,9%, comparando os anos de 2002 e 2003, e de tendência semelhante em 2004, à produção de camarões cultivados (utilizando como referência o camarão exportado) tem apresentado forte queda quando se faz uma comparação entre os anos de 2003 e 2004, o que significa redução dos níveis de produtividade devido ao vírus da mionecrose infecciosa – IMNV (ROCHA et al., 2004).

Nesse estudo foi verificada a capacidade imunoestimulante do Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) extraído da alga marinha *Solieria filiformis* em juvenis de camarões marinhos, *Litopenaeus vannamei*, submetidos à exposição por extratos de camarões infectados com o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) com o intuito de se incrementar a sobrevivência dos mesmos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta da alga e extração do Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) da alga marinha *Solieria filiformis*

A alga marinha *Solieria filiformis* foi coletada na Praia do Pacheco, Município de Caucaia - Ceará, durante a maré baixa. Em seguida, a mesma foi transportada em saco plástico até o Laboratório de Bioquímica Marinha (DEP/CCA/UFC), sendo cuidadosamente lavada com água destilada para retirar sais e separá-la das epífitas. Após a limpeza, a alga foi desidratada à luz solar e cortada em pequenos pedaços para, posteriormente, ser submetida ao processo de extração.

Para extração, amostras da alga seca e triturada foram hidratados com 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5mM. Em seguida, foram adicionados 7 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg/mL) para digerir o tecido da alga, sendo a mistura incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após esse período, o material foi filtrado em tela de 60 µ, centrifugado a 15.000 rpm e, ao sobrenadante, foram adicionados 6,4 mL de cloreto de cetilpiridínio (CPC) a 10% para a precipitação dos polissacarídeos presentes na mistura por, no mínimo, 24 horas à temperatura ambiente. Logo após a precipitação, os polissacarídeos sulfatados foram lavados com 200 mL de CPC 0,05% sendo, em seguida, dissolvidos em 70 mL de cloreto de sódio 2 M:etanol absoluto (100:15;v/v) em banho-maria (60°C) e submetidos a uma nova precipitação por, no mínimo, 24 horas a 4°C através da adição de mais 122 mL de etanol absoluto. Em seguida, o material foi centrifugado e submetido a duas lavagens com 200 mL de etanol a 80% e uma com 120 mL de etanol absoluto. Após esta etapa, os polissacarídeos sulfatados foram então levados à estufa a 60°C, por um período aproximado de 24 horas para secagem e obtenção do extrato bruto total de acordo com FARIAS et al (2004). Um esquema mostrando todos os passos da extração por este método está apresentado no fluxograma abaixo. (Figura 1).

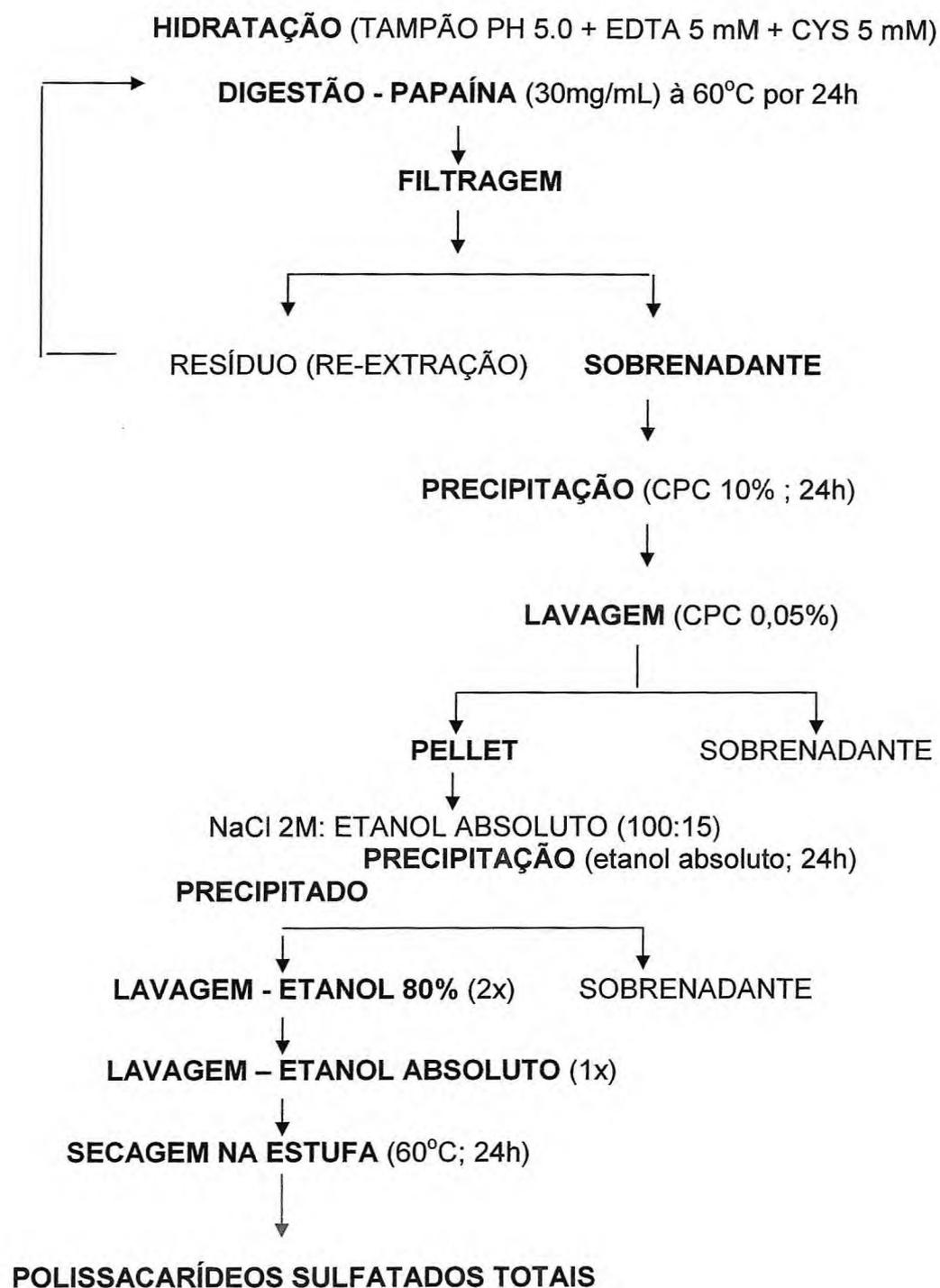
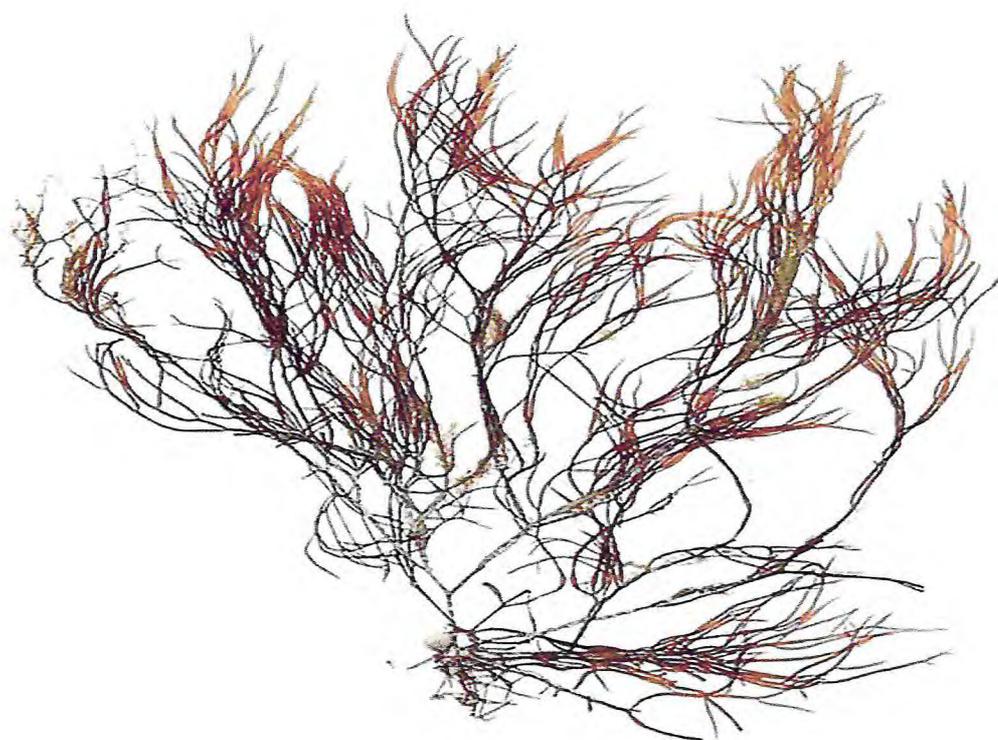
Figura 1: Fluxograma de extração de Polissacarídeos Sulfatados.

Figura 2: Alga marinha *Solieria filiformis*



Fonte: David L. Ballantine e Nilda E. Aponte.

2.2. Dietas-teste

Para o procedimento experimental, 4 dietas-teste foram produzidas pela DISPA Indústria de Rações S.A. (Maracanaú, Ceará, Brasil), tendo sido formuladas para conter 35% proteína e 8% de gorduras. Todas as dietas-teste apresentaram a mesma composição, exceto para o nível de PSB adicionado para conter 0 (Controle Infectado – CI – e Controle Não-Infectado – CNI), 4, 8 e 12 g de PSB/kg de dieta-teste. O Polissacarídeo foi incorporado na ração umedecida com água destilada e misturado manualmente. Após a incorporação ou não do PSB, as dietas-teste em estado úmido foram submetidas a peletização, fazendo-se uso de um moinho de carnes adaptado para esse processo. Em seguida, as dietas-teste peletizadas foram submetidas à secagem em estufa a 40 °C por 48 h e, posteriormente, utilizadas no procedimento experimental.

Desta forma, com base em uma alimentação de 5% do peso corpóreo do camarão, para as concentrações de 4, 8 e 12 g de PSB/kg de dieta-teste, a oferta diária de PSB incorporado na dieta foi 0,2, 0,4 e 0,6 g.kg⁻¹ de camarão, respectivamente.

2.3. Preparação do extrato viral

Camarões infectados com o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), apresentando opacidade do músculo estriado abdominal, foram coletados de fazendas de camarões localizadas em Camocim, Ceará, Brasil. Os camarões infectados com o IMNV foram homogeneizados em solução salina (1:1, p/v), a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado através de uma membrana 0,45µm e o conteúdo filtrado foi diluído na água dos aquários na proporção citada através de tubos de ensaios.

Figura 3: Rações com 4, 8 e 12 g de PSB/kg de dietas-teste.



Fonte: Tarcísio B. Lima Júnior e André Luiz F. de Souza

2.4. Delineamento Experimental

Camarões marinhos do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, aparentemente saudáveis, foram obtidos na fazenda de camarões marinhos Aquaclara Ltda, localizada no município de Paraipaba, Ceará, Brasil, e transportados em caixas isotérmicas para o Laboratório de Aqüicultura (DEP/CCA/UFC), tendo sido mantidos durante duas semanas em tanques de 2.000 L para aclimação.

No Laboratório de Aqüicultura (DEP/CCA/UFC), foram selecionados 200 camarões com peso médio corpóreo inicial de $4,5 \pm 1,0$ g. Os camarões foram divididos em cinco grupos: 0 (CI e CNI), 4, 8 e 12 g de PSB/kg de dieta-teste. Para os grupos controle e tratamentos, utilizou-se quatro repetições com dez indivíduos por repetição. As repetições foram realizadas em aquários de 40 L com água do mar e aeração constante. A taxa de renovação de água foi em torno de 25% ao dia.

Durante os primeiros quatro dias do procedimento experimental, os camarões foram alimentados normalmente com as dietas-teste desenvolvidas. No 5º dia, os camarões foram infectados com o extrato viral por 8 horas, com exceção do CNI. A infecção pelo vírus causou a morte de camarões após 5-8 dias do procedimento de infecção viral. As dietas-teste foram ofertadas continuamente por 15 dias. Os camarões foram alimentados 2 vezes ao dia, as 09:00 e as 14:00. A taxa de arraçoamento variou entre 5-7% do peso médio corpóreo e foi ajustada de acordo com a resposta alimentar dos camarões em cada aquário. Os restos alimentares e os excrementos eram sifonados depois da alimentação. (Durante o processo de alimentação, a temperatura da água permaneceu entre 29-31° C, a salinidade de 28-30 ppm e o pH 7,7-8,2.)

2.5. Crescimento e sobrevivência

A taxa de crescimento foi expressa como a diferença entre o peso corpóreo no início e no final do experimento, tendo sido expressa como o Coeficiente de Crescimento Diário (CCD, %) de acordo com a equação a seguir (BUREAU et al., 2000):

$CCD = 100 \times [(\text{peso final})^{1/3} - (\text{peso inicial})^{1/3}] / \text{dias de cultivo}$. A sobrevivência foi calculada pela diferença entre o número de animais vivos no início e no final do experimento.

2.6. Coleta de hemolinfa e preparação do soro

Para a coleta da hemolinfa, os camarões foram secos com papel toalha e uma agulha acoplada a uma microseringa foi inserida na base do 5.º par de pereópodos. Para a preparação do soro, foram retirados 50µL de hemolinfa por camarão (3 camarões por repetição) e, imediatamente, diluídos em 450µL de solução de Elsevier (100mM glicose, 20 mM NaCl e 30mM citrato de sódio, pH 7,2). Posteriormente, as amostras obtidas foram centrifugadas a 2000 x g por 30 minutos. O soro (sobrenadante) foi utilizado para análise posterior.

2.7. Concentração de proteína no soro

A concentração de proteína total do soro dos camarões foi determinada usando o método de BRADFORD (1976). A albumina sérica bovina foi utilizada como proteína padrão.

2.8. Atividade hemaglutinante

Testes de hemaglutinação foram feitos usando uma suspensão a 2% de eritrócitos de coelho tratados com tripsina de acordo a metodologia descrita por AINOUIZ et al. (1992). Para cada soro testado, diluições seriadas com duas

repetições foram feitas usando a solução de Elsevier. Um igual volume da suspensão de eritrócitos a 2% foi adicionado para cada diluição. Depois de 1 hora a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 30 s e o grau de aglutinação macroscópica foi observado. A atividade hemaglutinante foi expressa como a concentração mínima de proteína capaz de causar aglutinação.

2.9. Especificidade por açúcares

A especificidade por açúcares da atividade hemaglutinante foi realizada fazendo-se uso de açúcares e de polissacarídeos de algas marinhas. O ensaio foi realizado fazendo-se diluições seriadas dos açúcares com a solução de Elsevier, seguindo-se de incubação com o soro dos camarões (em uma concentração final com 4 unidades de hemaglutinação ou 4 UH) por 1 hora a temperatura ambiente, previamente ao ensaio de aglutinação. Posteriormente, uma suspensão a 2% de eritrócitos de coelho tratados com tripsina foi adicionada. A capacidade de inibição da atividade hemaglutinante foi expressa como a concentração mínima de açúcar capaz de inibir completamente uma atividade de 4 UH.

2.10. Análise estatística

A significância estatística ($P < 0,05$) das diferenças entre as taxas de crescimento e entre as taxas de sobrevivência dos grupos controles (CI e CNI) e dos tratamentos foi analisada por ANOVA bi-fatorial e através do teste de diferença significativa de Tukey, descritos por CENTENO (1999).

3 - RESULTADOS

3.1. Extração do Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis*

No presente experimento, obteve-se um rendimento de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis* de $42,02 \pm 1,37\%$ (n=3) e um conteúdo de galactose do polissacarídeo de $0,65 \pm 0,08$ g/g de extrato (n=3).

3.2. Efeito do Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis* sobre o crescimento e sobrevivência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV

O Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis* não causou diferenças significativas ($p > 0,05$) no crescimento de camarões *Litopenaeus vannamei* quando os tratamentos foram comparados com os grupos-controle (Controle Infectado – CI e Controle Não-Infectado – CNI), contudo, houve diferença significativa ($p < 0,05$), entre as sobrevivências observadas nos tratamentos onde se fez as maiores inclusões de PSB na dieta (8g PSB/kg e 12 g PSB/kg), e o CI, ao final do experimento (Tabelas 1, 2 e 3), evidenciando uma ação imunoestimulante. As taxas de sobrevivência dos camarões *Litopenaeus vannamei* alimentados com PSB de *Solieria filiformis* nas concentrações de 4, 8 e 12 g/kg de ração foram de $72,5 \pm 9,6\%$, $77,5 \pm 9,6\%$ e $77,5 \pm 9,6\%$, respectivamente (Figura 3).

3.3. Efeito do Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) sobre o teor protéico e a atividade hemaglutinante na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV

O teor protéico, a atividade hemaglutinante e a atividade específica na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV e alimentados com PSB foram maiores que nos controles livres de PSB. A atividade hemaglutinante na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com

IMNV foi incrementada com o uso de PSB. Com o uso de PSB de *S.filiformis*, o incremento da atividade hemaglutinante na hemolinfa foi até 4 vezes maior. A atividade específica nos grupos de camarões que receberam dietas contendo PSB de *Solieria filiformis* a 8 e 12 g/kg de ração foi superior ao grupo alimentado com dieta a 4 g/kg de ração (Tabela 4). Os resultados de inibição da atividade hemaglutinante na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV estão presentes na Tabela 5. A hemaglutinina foi inibida por GlcNAc e GalNAc. Vários polissacarídeos foram testados, sendo que carragenana não apresentou efeito inibitório até uma concentração máxima de 2,5 mg/mL.

Tabela 1- Resultado da análise de variância sobre o ganho de peso de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV e alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis*.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,908983	4	0,227246	0,793054	0,547763	3,055568
Dentro dos grupos	4,298176	15	0,286545			
Total	5,20716	19				

SQ=Soma dos quadrados; GL=Grau de liberdade; MQ=média dos quadrados ; F= Frequência calculada; Valor ^{-P}= Probabilidade; F crítico= Frequência tabelada.

Tabela 2 - Resultado da análise de variância sobre a taxa de sobrevivência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV e alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis*.

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	13,3	4	3,325	5,391892	0,006788	3,055568
Dentro dos grupos	9,25	15	0,616667			
Total	22,55	19				

SQ=Soma dos quadrados; GL=Grau de liberdade; MQ=média dos quadrados ; F= Freqüência calculada; Valor ^{-P}= Probabilidade; F crítico= Freqüência tabelada.

Tabela 3 - Ganho de peso, taxa de crescimento e sobrevivência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV e alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis*.

Dietas	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso (g)	CCD (%)	Sobrevivência (%)
CI	4,43±1,00	6,79±0,39	2,36±0,49	1,26±0,25	65,0±5,8 ^a
CNI	4,44±0,97	7,13±0,15	2,69±0,21	1,41±0,13	90,0±0,0 ^b
4 g PSB/kg	4,47±1,06	7,33±0,35	2,86±0,80	1,48±0,43	72,5±9,6 ^a
8 g PSB/kg	4,51±0,95	6,84±0,63	2,34±0,65	1,23±0,31	77,5±9,6 ^b
12 g PSB/kg	4,24±0,97	6,61±0,27	2,37±0,30	1,29±0,15	77,5±9,6 ^b

Média ± D.P. de 4 repetições. Cada repetição possui 10 camarões por aquário.

Médias com letras diferentes em subscrito são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

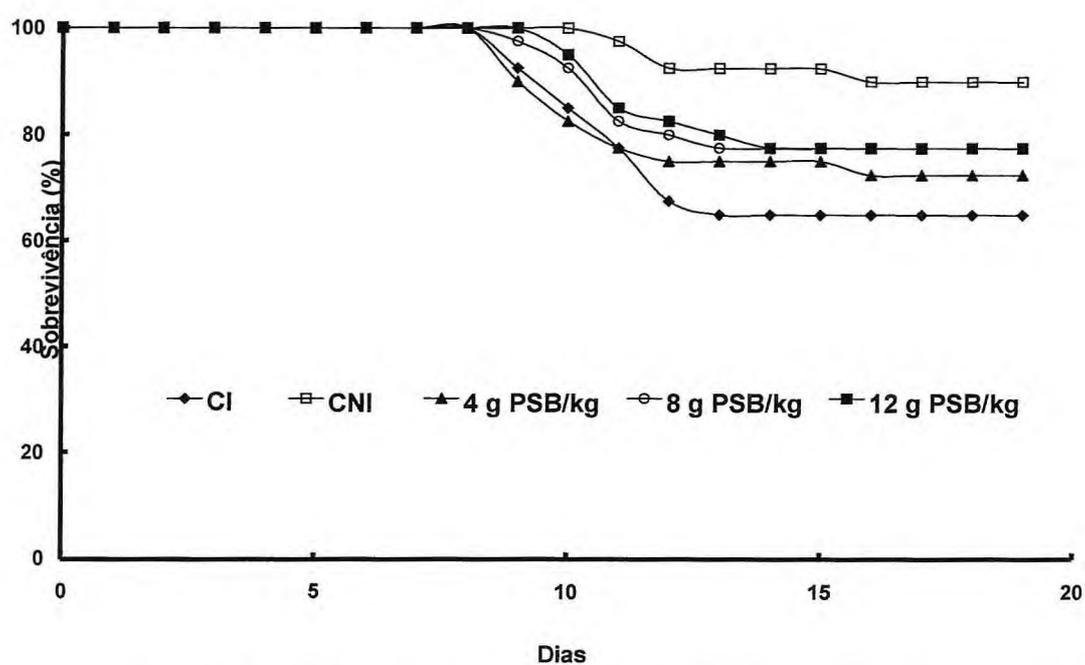


Figura 4: Taxa de sobrevivência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV e alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis*. CI – Controle infectado; CNI – Controle não infectado.

Tabela 4: Conteúdo de proteína e atividade hemaglutinante da hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV e alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis*.

Dietas	Proteína total (mg)	UH total ^a	Atividade específica ^b
CI	58,85	48	0,82
CNI	74,61	48	0,64
4 g PSB/kg	94,33	96	1,02
8 g PSB/kg	85,98	192	2,23
12 g PSB/kg	107,69	192	1,78

^aUnidade de hemaglutinação usando uma suspensão a 2% de eritrócitos de coelho tratados enzimaticamente.

^bUH/Proteína total.

Tabela 5: Inibição da atividade hemaglutinante na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV e alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis*.

Açúcares e outros inibidores	Concentração mínima inibitória ^a
Monossacarídeos	
GlcNAc	12,5 mM
GalNAc	12,5 mM
Polissacarídeos sulfatados	
Fucoidan	0,31 mg/mL
PSB de <i>B. occidentalis</i>	0,62 mg/mL
PSB de <i>Solieria filiformis</i>	0,62 mg/mL

Outros açúcares sem atividade inibitória em 50 mM são D-galactose, α -lactose, D-fucose, L-fucose, D-glucose, D-mannose, β -lactose, methyl-D-galactose, lactulose, D-arabinose, Methyl- α -D-glucopyranoside, Methyl- α -D-galactopyranoside. Carrageenan não foi inibitória em 2,5 mg/mL.

^aConcentração mínima para a inibição total de 4 HU na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV usando uma suspensão de 2% de eritrócitos de coelho tratados enzimaticamente.

4 – DISCUSSÃO

Nos últimos anos, pesquisas desenvolvidas sobre a atividade de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vêm demonstrando aplicação em estudos de muitas viroses (WITVROUW & DE CLEQ, 1997; DUARTE et al., 2001; MATSUHIRO et al., 2005), inclusive as que tem causado mortalidade em massa em camarões cultivados, como o WSSV (CHOTIGEAT et al., 2004).

Polissacarídeos sulfatados têm sido extraídos de diferentes espécies de algas vermelhas, como *Botryocladia occidentalis*, *Bostrychia montagnei*, *Georgiella confluens*, *Gracilaria cornea*, *Porphyra capensis*, e são formadas geralmente de unidades de galactose (FARIAS et al. 2000; DUARTE et al. 2001; KOLENDER & MATULEWICZ, 2002; MELO et al., 2002; ZHANG et al., 2005). O rendimento dos extratos de *Solieria filiformis* foi semelhante aos valores obtidos de outras espécies de algas (WATT et al., 2002; ZHANG et al., 2005). No entanto, o método de extração de polissacarídeos sulfatados usados neste experimento foi muito caro quando comparado a outros procedimentos, como o método do HCL (CHOTIGEAT et al., 2004) ou o método de extração por água quente (HOU & CHEN, 2005; YEH et al., 2006).

O IMNV é pouco virulento se comparado a outros vírus como o WSSV, porém o IMNV tem causado impacto econômico altamente negativo em cultivos de camarões *Litopenaeus vannamei* no Nordeste do Brasil. Neste experimento, a mortalidade atingiu 35,0 – 37,5% em 5 – 8 dias, enquanto que para camarões infectados com WSSV a mortalidade pode chegar a 100% em 4 – 7 dias (CHANG et al., 2003; CHOTIGEAT et al., 2004). Esses resultados são consistentes com os verificados por GRAF et al. (2003) que observaram mortalidades 34,67% em camarões *Litopenaeus vannamei* expostos ao IMNV durante um experimento de transmissão horizontal da doença. Durante o experimento, além da coleta de indivíduos mortos, foi observada, através da análise de prevalência, a evolução visual da enfermidade nos indivíduos infectados (Figuras 6-8), de acordo com o sugerido por FONSECA & ROCHA, 2004. Visualmente, camarões infectados foram

observados com graus de infecção G1, G2 e G3 (Figuras 6, 7 e 8), mas não houve contagem destes indivíduos (dados não publicados).

Nenhuma evidência mostrou o efeito positivo da dieta de PSB no crescimento de camarões *Litopenaeus vannamei*, porém os resultados indicam que a administração de PSB aumenta a taxa de sobrevivência dos camarões. No entanto, o PSB de *Solieria filiformis* na concentração de 4 g/kg de ração não teve o mesmo efeito na sobrevivência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV. Imunoestimulantes extraídos de algas marinhas melhoraram a sobrevivência de camarões contra patógenos e incrementam o sistema imunológico não-específico. O uso de extrato bruto fucoídano extraída da alga marinha parda *Sargassum polycystum* também apresentou redução no impacto do WSSV no camarão tigre *P. monodon* (CHOTIGEAT et al., 2004).

Aglutininas e/ou lectinas são proteínas ou glicoproteínas com capacidade de ligarem-se especificamente a polissacarídeos expressos na superfície de diferentes células, causando sua aglutinação. Sabe-se que as lectinas participam do sistema imunológico dos crustáceos através da recombinação de açúcares específicos da parede celular dos microorganismos (SHARON & LIS, 1989). Devido ao fato de as lectinas ligarem-se a carboidratos e promover a aglutinação de diferentes células, tais como bactérias e outros patógenos invasores, é sensato assumir que essas moléculas possam ser consideradas por assumir um papel potencial nas reações imunológicas dos invertebrados. Essas proteínas podem aglutinar microorganismos e melhorar a fagocitose pela ligação entre a superfície do hemócito e a molécula estranha, e são aparentemente sintetizadas pelos hemócitos dos invertebrados (MARQUES & BARROCCO, 2000).

Neste estudo, a atividade hemaglutinante na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com IMNV foi aumentada com o incremento de PSB. A atividade hemaglutinante na hemolinfa de camarões infectados com IMNV e alimentados com Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) de *Solieria filiformis* foi aumentada em 192 unidades quando comparadas com 48 unidades do grupo controle. Estes resultados sugerem que o polissacarídeo sulfatado possa ter propriedades imunoestimulantes potenciais. De acordo com MARQUES e

BARROCCO (2000), o potencial de lectinas em camarões poderia ser de relevância particular. Considerando que estas moléculas realmente são envolvidas em reações de defesas imunológicas, o aumento na concentração delas poderia conferir virtualmente uma proteção melhor ao organismo contra invasores patógenos. Por outro lado, a atividade aglutinante na hemolinfa de camarões *P. monodon* alimentado com imunoestimulante comercial (PENSTIM) e dois produtos experimentais (BRM-01 e BRM-02) foi semelhante ao grupo controle (SRITUNYALUCKSANA et al. 1999).



Figura 5: Grau ZERO (G - 00), (Recomendações de Boas Práticas de Manejo na Prevenção de Enfermidades, ABCC, 2004).



Figura 6: Grau UM (G - 01), (Recomendações de Boas Práticas de Manejo na Prevenção de Enfermidades, ABCC, 2004).



Figura 7: Grau DOIS (G - 02), (Recomendações de Boas Práticas de Manejo na Prevenção de Enfermidades, ABCC, 2004).



Figura 8: Grau TRÊS (G - 03), (Recomendações de Boas Práticas de Manejo na Prevenção de Enfermidades, ABCC, 2004).

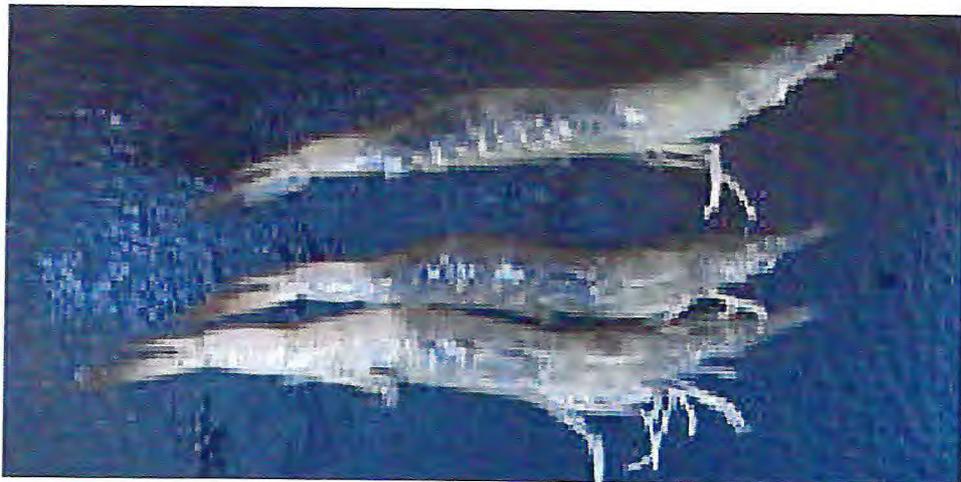


Figura 9: Grau QUATRO (G - 04), (Recomendações de Boas Práticas de Manejo na Prevenção de Enfermidades, ABCC, 2004).

5 - CONCLUSÃO

Os resultados sugerem uma possível função imunoestimulante do Polissacarídeo Sulfatado Bruto (PSB) da alga marinha *Solieria filiformis*, pois sua incorporação em dietas comerciais, nas concentrações de 8 e 12 g/kg, aumentou a sobrevivência ao vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) em juvenis de camarões *Litopenaeus vannamei*. Por outro lado, outros estudos sobre a administração do PSB como ferramenta para incrementar a sobrevivência de camarões devem ser conduzidos com o objetivo de avaliar a atividade imunoestimulante da alga marinha *Solieria filiformis* em estratégias de controle para enfermidades de origem viral, e isso só será possível através de um programa de cultivo de algas marinhas com o objetivo de minimizar o impacto ambiental pela coleta irresponsável das mesmas, para assim podermos extrair o polissacarídeo para atividades imunoestimulantes, objetivando ofertar uma dieta adequada com intuito de aumentar a taxa de sobrevivência de camarões nos períodos de infecção viral nas fazendas comerciais.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINOUZ, I.L., SAMPAIO, A.H., BENEVIDES, N.M.B., PONTE-FREITAS, A.L., COSTA, F.H.F., CARVALHO, M.R., PINHEIRO-JOVENTINO, F., 1992. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algal extracts. **Bot. Mar.**, v. 35, 475–479.

ALDAY-SANZ, V., THAIKUA, S., YOUSIF, A.N., ALBRIGHT, L.J., FLEGEL, T.W., 1998. Studies on Igy for passive immunization of shrimp against white spot syndrome virus. In: Flegel, T.W. (Ed.), **Advances in Shrimp Biotechnology**. Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp. 141–143.

BOONYARATPALIN, S., BOONYARATPALIN, M., SUPAMATTAYA, K., TORIDE, Y., 1995. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune response, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In: Shariff M, Arthur JR, Subasinghe P, editors. **Disease in Asian aquaculture II**. Fish health section (Philippines): Asian Fisheries Society; pp. 467-77.

BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, pp. 248–254.

BROCK, J.A., 1988. Idiopathic muscle necrosis. In: Sindermann, C.J., Lightner, D.V. (Eds.), **Disease Diagnosis and control in North American Marine Aquaculture**. Amsterdam, pp. 156-158.

BUREAU, D.P., AZEVEDO, P.A., TAPIA-SALAZAR, M., CUZON, G., 2000. Pattern and cost of growth and nutrient deposition in fish and shrimp: potential implications and applications. In: Cruz-Suárez, E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Civera-Cerecedo, R. (Eds.), *Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, Published by CINVESTAV-Mérida, México. **Avances de Nutrición Acuícola**, pp. 25–49.

CAMPA-CÓRDOVA, A.I., HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N.Y., PHILIPPIS, DE R., ASCENCIO, F., 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to b-glucan and sulphated polysaccharide. **Fish Shellfish Immunol**, v. 12, pp. 353–366.

CENTENO, A.J., 1999. **Curso de Estatística Aplicada à Biologia**. 2. ed. Goiânia: Editora da UFG., 234 pp.

CHANG, C.F., Chen, H.Y., Su, M.S., Liao, I.-C., 2000. Immunomodulation by dietary α 1-3 glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol**, v.10, pp. 505– 514.

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

CHOTIGEAT, W., TONGSUPA, S., SUPAMATAYA, K., PHONGDARA, A., 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 233, pp. 23-30.

DUARTE, M.E.R., NOSEDA, D.G., NOSEDA, M.D., TULIO, S., PUJOL, C.A., DAMONTE, E.B., 2001. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8, pp. 53–58.

ENG, C.T., PAW, J.N., GUARIN, F.Y., 1989. The environmental impact of aquaculture and the effects of pollution on coastal aquaculture development in Southeast Asia. **Mar. Pollut. Bull**, v. 20, pp. 335-343.

FAO, 2002a. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome, Italy, 150 pp.

FAO, 2002b. **Yearbook of Fisheries Statistics 2002**. Rome, Italy. <http://www.fao.org/fi/statist/summtab/default.asp>.

FARIAS, W.R.L.; REBOUÇAS, H.J.; TORRES, V.M.; RODRIGUES, J.A.G.; PONTES, G.C.; SILVA, F.H.O.; SAMPAIO, A.H. 2004. Enhancement of growth in tilapia larvae (*O. niloticus*) by sulfated d-galactans extracted from the red marine alga *Botryocladia occidentalis*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 35, número especial, pp. 189-195.

FARIAS, W.R.L., 2000. **Estrutura e atividades anticoagulante e antitrombótica de galactanas sulfatadas da alga vermelha *Botryocladia occidentalis***. Tese (Doutorado) – Departamento de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pp. 102.

FONSECA, C., ROCHA, I.P., 2004. **Recomendações de boas práticas de manejo na prevenção de enfermidades**. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão – ABCC, 34 p.

GATESOUBE, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 180, pp. 147-165.

GRAF, C., GERVAIS, N., FERNANDES, M.P.C., AYALA-AVILEZ, J.C., 2003. Transmissão da síndrome da necrose muscular idiopática (NMI) em *Litopenaeus*

vannamei. **Revista da Associação Brasileira dos Criadores de Camarão – ABCC**, v. 4, pp. 45–47.

HAUTON, C., HAWKINS, L.E., HUTCHINSON, S., 2000. The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonella anguillarum*) and components of a host (*Ostrea edulis*) immune system. **Comp. Biochem. Physiol** v. 127B, pp. 203–212.

HOU, W.Y., CHEN, J.C., 2005. The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 19, pp. 127–138.

ITAMI, T., ASANO, M., TOKUSHIGE, K., JUBONO, K., NAKAGAWA, A., TAKENO, N., NISHIMURA, H., MAEDA, M., KONDO, M., TAKAHASHI, Y., 1998. Enhancement of disease resistance of karuma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 164, pp. 277–288.

KAUTSKY, N., RÖNNBÄCK, P., TEDENGREN, M., TROELL, M., 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 191, pp. 145-161.

KOLENDER, A.A., MATULEWICZ, M.C., 2002. Sulfated polysaccharides from the red seaweed *Georgiella confluens*. **Carbohydrate Research**, v. 337, pp. 57–68.

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: **Abstract Book of Aquaculture 2004**. Honolulu, Hawaii, EUA, p. 353.

MARQUES, M.R.F., BARRACCO, M.A., 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, pp. 23–44.

MATSUHIRO, B., CONTE, A.F., DAMONTE, E.B., KOLENDER, A.A., MATULEWICZ, M.C., MEJÍAS, E.G., PUJOL, C.A., ZÚÑIGA, E.A., 2005. Structural analysis and antiviral activity of a sulfated galactan from the red seaweed *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 340, pp. 2392–2402.

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

NAYLOR, R.L., GOLDBURG, R.J., MOONEY, H., BEVERIDGE, M., CLAY, J., FOLKE, C., KAUTSKY, N., LUBCHENCO, J., PRIMAVERA, J., WILLIAMS, M.,

1998. Nature's subsidies to shrimp and salmon farming. *Science*, v. 282, pp. 883-884.

ROCHA, I.R.C.B., LIMA, F.M., GONÇALVES, F.A., SAMPAIO, A.H., COSTA, F.H.F., 2004. Las camaronerías de *Litopenaeus vannamei* en el estado de Ceará (Brasil): la problemática ambiental. In: **III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura**, Zaragoza, España, 680-688.

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

SCHOLZ, U., GARCIA-DIAZ, G., RICQUE, D., CRUZ-SUAREZ, L.E., VARGAS-ALBORES, F., LATCHFORD, J., 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*, Amsterdam, v.176, pp. 271-283.

SHARON, N.; LIS, H., 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, v. 246, pp. 227-234.

SONG, L., LIU, J.J., CHAN, L.C., SUNG, H.H., 1997. **Glucan induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*)**. *Developments in Biological Standardisation*, v.90, pp. 413-421.

SRITUNYALUCKSANA, K., SITHISARN, P., WITHAYACHUMNARNKUL, B., FLEGEL, T.W. 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish Shellfish Immunol*, v. 9, pp. 21-30.

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

SUNG, H.H., YANG, Y.L., SONG, Y.L., 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, via immunostimulation. *Journal of Crustacean Biology*, v. 16, pp. 278-284.

SUNG, H.H., CHANG, H.J., HER, C.H., CHANG, J.C., SONG, Y.L., 1998. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Invertebr. Pathol*, v. 71, pp. 26-33.

TAKAHASHI, Y., KONDO, M., ITAMI, T., HONDA, T., INAGAWA, H., NISHIZAWA, T., SOMA, G.I., YOKOMIZO, Y., 2000. Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). *Fish Shellfish Immunol*, v. 10, pp. 555-558.

WATT, D.K., O'NEILL, S.A., PERCY, A.E., BRASCH, D.J., 2002. Isolation and characterisation of a partially methylated galacto-glucurono-xylo-glycan, a unique

polysaccharide from the red seaweed *Apophloeoa lyallii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, pp. 283–294.

WITVROUW, M., DE CLERQ, E., 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **Gen. Pharmacol**, v. 29, pp. 497–511.

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

ZHANG, Q., QI, H., ZHAO, T., DESLANDES, E., ISMAELI, N.M., MOLLOY, F., CRITCHLEY, A.T., 2005. Chemical characteristics of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 340, pp. 2447–2450.