



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

RICARDO BESERRA XAVIER

**EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DAS ALGAS MARINHAS
Gracilaria birdiae, *Solieria filiformes* e *Lobophora variegata*, NA RESISTÊNCIA DE
NÁUPLIOS DE ARTÊMIA SUBMETIDOS A ESTRESSE SALINO.**

FORTALEZA, NOVEMBRO 2010



RICARDO BESERRA XAVIER

**EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DAS ALGAS MARINHAS
Gracilaria birdiae, *Solieria filiformes* e *Lobophora variegata*, NA RESISTÊNCIA DE
NÁUPLIOS DE ARTÊMIA SUBMETIDOS A ESTRESSE SALINO.**

**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.**

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

**FORTALEZA
2010**

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)

X23e Xavier, Ricardo Beserra.
Efeito dos polissacarídeos sulfatados das algas marinhas *Gracilaria birdiae*, *Solieria filiformes* e *Lobophora variegata*, na resistência de náuplios de artêmia submetidos a estresse salino / Ricardo Beserra Xavier. – 2010.
28 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2010.
Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

1. Polissacarídeo. 2. Estresse salino. 3. Náuplios de artêmias. I. Título.

CDD 639.2

RICARDO BESERRA XAVIER

**EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DAS ALGAS MARINHAS
Gracilaria birdiae, *Solieria filiformes* e *Lobophora variegata*, NA RESISTÊNCIA DE
NÁUPLIOS DE ARTÊMIA SUBMETIDOS A ESTRESSE SALINO.**

**Monografia submetida a Coordenação do curso de graduação em Engenharia de Pesca,
da Universidade Federal do Ceara, como requisito parcial para a obtenção do título de
Engenheiro de Pesca.**

Aprovada em: ____/____/____:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Wladimir Ronald Lobo Farias, D.Sc.
Orientador/Presidente

Prof. Celso Shiniti Nagano, D.Sc.
Membro

Prof. Renato Teixeira, M.Sc.
Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** que sempre me ajudou em todas as vezes que eu precisei até agora.

Aos meus pais **José Raimundo e Lidoína** que sempre estiveram ao meu lado e fizeram tudo o que podiam por mim desde que eu nasci.

Aos meus irmãos **Arthur e Renata** que sempre estiveram do meu lado em todas as situações e sempre me ajudaram com o que podiam.

A minha namorada **Bárbara** que está comigo a alguns anos e que além de tudo ainda me deu uma filha maravilhosa que é a **Alice** que tem sido uma grande fonte estímulo para mim.

Aos meus grandes amigos **Ariadne e Fred** que me ajudaram muito nesse trabalho e aos meus amigos do laboratório: **Rafael, Carol e Regi**.

A todos os meus primos e tios com quem tento sempre manter o contato e que estão muito presentes na minha vida.

A todos os meus amigos que me acompanharam até agora tanto dos tempos de colégio como os amigos que fiz na faculdade.

Ao professor **Wladimir Ronald Lobo Farias** meu orientador, pela paciência e pela grande ajuda que me ofereceu para a conclusão desta monografia.

Aos meus amigos de trabalho do Yázigi que conheço a pouco tempo mas já tenho uma forte ligação com todos eles.

RESUMO

Um dos maiores problemas na aquicultura atual é a necessidade de se utilizar elevadas densidades nos cultivos para se obter bons lucros. No entanto, esta prática muitas vezes resulta em um aumento das taxas de mortalidade, pois leva os organismos a situações de estresse e, conseqüentemente, queda no sistema de defesa. Atualmente vários compostos têm sido utilizados como imunoestimulantes na aquicultura, dentre eles os polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas. O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos dos polissacarídeos sulfatados brutos das algas marinhas *Gracilaria birdiae*, *Solieria filiformes* e *Lobophora variegata*, bem como de suas frações purificadas em coluna de troca iônica, na resistência de náuplios de artêmia submetidos a um estresse salino com salmoura concentrada (350 g/L). Os PS brutos foram purificados em uma cromatografia de DEAE-celulose, quando foram avaliados o teor de açúcar e a atividade metacromática das frações eluídas com diferentes concentrações de NaCl. Após a administração dos PS brutos e de suas frações aos náuplios, foram observadas diferenças significativas em relação ao controle que não foi exposto aos PS. Desta forma, o teste do estresse salino utilizando náuplios de artêmia é uma maneira rápida e eficaz para se avaliar o potencial de PS de algas marinhas no aumento da resistência de crustáceos submetidos à condições adversas.

Palavras-chave: Polissacarídeo, estresse salino, náuplios de artêmias.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	11
1.1.	Importância da aquicultura.....	11
1.2.	Uso de imunoestimulantes na aquicultura.....	12
1.3.	Polissacarídeos sulfatados.....	12
1.4.	Uso de polissacarídeos sulfatados na aquicultura.....	13
1.5.	Uso de náuplios de artêmia na aquicultura.....	14
2	Matériaís e métodos.....	16
2.1.	Coleta das algas.....	16
2.2.	Extração de polissacarídeos sulfatados.....	16
2.3.	Fracionamento em troca de coluna iônica.....	17
2.4.	Obtenção dos nauplios de artêmias.....	17
2.5.	Teste de estresse salino.....	17
3	Resultados e Discussão.....	18
3.1.	Fracionamento dos Polissacarídeos Sulfatados.....	18
3.2.	Efeito dos PS na resistência de náuplios de artêmia submetidos ao estresse salino.....	21
4	Conclusão.....	27
5	Referências.....	28

1. INTRODUÇÃO

1.1. A importância da aquicultura

A aquicultura é a criação de organismos aquáticos para fins comerciais e é vista como uma atividade com um grande potencial de atender a crescente demanda por alimentos de origem aquática (COSTA-PIERCE et al., 2002).

Com a estagnação e até queda das pescarias, a aquicultura irá desempenhar um papel muito importante para satisfazer o aumento da demanda por frutos do mar (TACON et al., 2003). No entanto, a aquicultura como qualquer outra atividade produtiva é geradora de impactos ambientais, especialmente pelos efluentes oriundos dos cultivos intensivos (ASSAD; BURSZTYN, 2000).

O desenvolvimento da piscicultura comercial tem sido direcionado para o uso de sistemas de cultivo cada vez mais intensivos. A intensificação dos processos de produção tem como objetivo alcançar uma maior produtividade em menores áreas, em menor tempo e a custo reduzido (KUBITZA, 1999).

As elevadas densidades de estocagem, praticadas na aquicultura intensiva, ocasionam problemas ambientais, pois devido ao lançamento dos efluentes de cultivo destes organismos, ricos em dejetos orgânicos, o resultado em uma maior eutrofização (VADSTEIN et al., 1993).

A aquicultura intensiva, por outro lado, acaba trazendo problemas para o próprio ambiente de cultivo, já que a alta carga de nutrientes gera uma desestabilização da comunidade bacteriana (ANDREWS; & HARRIS, 1986) e com isso ocorre uma seleção de organismos patogênicos oportunistas e proliferação de protozoários (SOULAP, 1999). Desta forma, as altas densidades populacionais também causam estresse nos organismos cultivados, o que provoca uma queda nas defesas naturais dos animais deixando-os mais susceptíveis a infecções (SMITH et al., 2003).

1.2. Uso de imunoestimulantes na aquicultura

Segundo Barbieri; Ostrensky (2002), o uso indiscriminado de antibióticos na carcinicultura intensiva se tornou uma prática comum entre os produtores de camarões e isso tem gerado grandes problemas ambientais e econômicos. Assim, as pesquisas na área têm sido direcionadas para outros meios para solucionar problemas de cultivo, prevenindo ou erradicando as enfermidades sem o uso de antibióticos (SMITH et al., 2003).

Uma solução que vem sendo estudada para evitar o uso de antibióticos na aquicultura é a utilização de imunoestimulantes, compostos que atuam aumentando a resistência inata dos organismos aquáticos cultivados contra uma grande variedade de doenças que, na maioria dos casos, são causados por patógenos oportunistas (RAA, 2000).

Muitos destes compostos denominados imunoestimulantes são constituintes da parede celular de microrganismos ou algas e seus principais princípios ativos são os proteoglicanos (PGs), lipopolissacarídeos (LPs), lipopeptídeos, polissacarídeos sulfatados (PS) (SONG; HUANG, 2000).

Segundo Smith e colaboradores (2003), os métodos mais adequados para a administração dos imunoestimulantes aos organismos aquáticos são a imersão e a incorporação dessas substâncias na ração dos animais, pois estas práticas são de fácil aplicação, não causam estresse e podem ser aplicadas rapidamente em grandes quantidades de animais.

1.3. Polissacarídeos sulfatados

As algas marinhas são organismos ricos em polissacarídeos sulfatados, moléculas que apresentam inúmeras atividades biológicas que despertam um enorme interesse nas ciências médicas e na biotecnologia de organismos aquáticos (CAMPA-CORDOVA et al., 2002; LIMA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2006; ZHANG et al., 2008). Já foram relatadas



várias atividades biológicas nos PS, tais como, anti-coagulante, anti-trombótica, anti-viral, anti-tumoral, anti-proliferativa e anti-inflamatória (BOISSON-VIDAL et al., 1995; ATHUKORALA et al., 2007).

Segundo NADER (2004), a atividade anti-coagulante dos PS é uma das atividades mais estudadas no mundo. Segundo o mesmo autor, as heparinas, não fracionadas e de baixo peso molecular, extraídas de mamíferos, são os únicos polissacarídeos sulfatados usados atualmente na produção de fármacos anti-coagulantes, embora estes compostos apresentem vários efeitos colaterais como o elevado risco de sangramentos, o que faz crescer a necessidade de busca por outras fontes de agentes anti-coagulantes.

A maioria dos polissacarídeos sulfatados, obtidos das algas marinhas, apresentam atividade anti-coagulante similar a heparina e esses polissacarídeos estão sendo extraídos de vários gêneros pertencentes as divisões Chlorophyta e Phaeophyta (FONSECA et al., 2008; MEDEIROS et al., 2008).

Apesar de ainda não existirem muitas pesquisas que usam as algas marinhas como fonte de polissacarídeos sulfatados, estudos recentes têm demonstrado ótimos resultados de atividades biológicas para os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas (MEDEIROS et al., 2008; KOYANAGI et al., 2003; ZUBIA et al., 2007).

1.4. Uso de polissacarídeos sulfatados na aquicultura

Recentemente, alguns pesquisadores têm realizado trabalhos para avaliar o efeito imunostimulantes dos polissacarídeos tanto para peixes como camarões (MILES et al., 2001; FARIAS et al., 2004).

A incorporação do PS da microalga *Spirulina platensis* na dieta do camarão *Penaeus merguensis* resultou em um aumento na atividade fagocítica dos seus hemócitos após uma exposição à um grupo de bactérias (LEE et al., 2003).

A adição dos polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentis* na dieta de pós-larvas de tilápias em diferentes dosagens, acarretou em um aumento significativo de peso dos peixes em uma determinada dose (REBOUÇAS et al., 2002)

Após os resultados apresentados é possível afirmar que existe uma relação entre a imunestimulação com polissacarídeos e o aumento da resistência dos indivíduos contra as infecções causadas por vírus ou bactérias ou situações de estresse (SAKAI, 1999), e com isso nasce a necessidade de se descobrir novos imunestimulantes.

1.5. Uso de náuplios de artêmia na aquicultura

As artêmias são pequenos crustáceos que servem como uma excelente fonte de alimentos na larvicultura de peixes e camarões, tanto no seu estágio de náuplio como no estágio adulto, já que eles possuem a vantagem de satisfazer as necessidades nutricionais de vários organismos aquáticos (SORGELLOOS et al., 2001).

As artêmias apresentam substâncias hormonais que induzem e reforçam a maturação sexual, aumentando as taxas de fertilização de peixes e camarões (NAESSENS et al., 1997; WOUTER et al., 2002; GANDY et al., 2007).

A composição bioquímica das artêmias é uma forte ferramenta para a otimização da nutrição e sobrevivência de algumas espécies aquícolas (McEVOY; SARGENT (1998) e estão sendo estudadas técnicas para melhorar a qualidade nutricional dos náuplios e metanáuplios de artêmias (RESS et al., 1994; SARGENT (1998); SORGELLOOS et al., 2003) mas esses métodos não se aplicam a juvenis de artêmia.

As pesquisas de enriquecimento de náuplios e metanáuplios de artêmias buscam o aumento do teor de lipídios, especialmente aqueles que possuem uma longa cadeia de ácidos graxos poliinsaturados, como os ácidos graxos docosahexanóico, eicosapentanóico e araquidônico (DHA, EPA e ARA,) (BARCLEY & ZELLER (1996); SARGENT et al., 1999a; SARGENT et al., 1999b; SORGELLOOS et al., 2001).

Desta forma, a incorporação de compostos benéficos para a saúde de organismos aquáticos, através da bioencapsulação, pode ser uma rápida forma de aumentar a resistência de animais de interesse, inclusive dos próprios náuplios.

O presente estudo avaliou a resistência dos náuplios de *Artêmia franciscana* submetidos a um estresse salino na presença de polissacarídeos sulfatados brutos e purificados, extraídos das algas marinhas *Lobophora variegata* (parda), *Gracilaria birdiae* e *Halymenia pseudofloresia* (vermelhas).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta e acondicionamento das algas

As algas marinhas utilizadas neste trabalho foram coletadas na Praia de Fleixeiras, durante as marés de sizígia. Depois de coletadas, foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas ao laboratório de Bioquímica Marinha – Biomar – do Departamento de Engenharia de Pesca, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará (DEP/CCA/UFC). No laboratório as algas coletadas foram lavadas com água destilada, separadas de epífitas e outros organismos, sendo finalmente secas em estufa com recirculação de ar a 60°C.

2.2. Extração dos polissacarídeos sulfatados

A extração dos polissacarídeos sulfatados foi realizada a partir de duas gramas de alga seca. Inicialmente, o tecido algal foi hidratado em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, contendo cisteína 5mM e EDTA 5mM. Em seguida, foi adicionado uma solução de papaína (30 mg/mL) preparada no mesmo tampão. A incubação foi realizada, por 24h, a 60 °C em um banho-maria com agitação ocasional. Após a digestão proteolítica, a mistura foi filtrada em tela fina (60 micra) e centrifugada (14.000 g; 20 min; 4°C). Os polissacarídeos sulfatados (PS) presentes no sobrenadante foram precipitados através da adição de uma solução de cloreto de cetilpiridina (C.P.C.) a 10%, por 24 h na temperatura ambiente. O resíduo da primeira extração foi novamente utilizado para outras incubações com o objetivo de se otimizar o rendimento. Após a precipitação dos PS, o material foi centrifugado e o precipitado foi lavado com uma solução de C.P.C. a 0,05% e novamente centrifugado. Em seguida, o precipitado foi dissolvido em uma solução de NaCl 2M:etanol absoluto (100:15, v/v) e os polissacarídeos sulfatados presentes na solução foram precipitados novamente através da adição de dois volumes de etanol absoluto, misturando bem, e deixando em repouso por 24h a 4°C. Após este período, a mistura foi novamente centrifugada com descarte do sobrenadante e lavagem do precipitado duas vezes com etanol 80% e uma vez com o

mesmo volume de etanol absoluto. Finalmente, o precipitado foi seco em estufa a 60 °C para obtenção dos polissacarídeos sulfatados totais.

2.3. Fracionamento em coluna de troca iônica

Cerca de 1,0 mL de uma solução do extrato bruto de polissacarídeos sulfatados (1,0 mg mL⁻¹) foi aplicado em uma coluna de DEAE-celulose, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 com 5 mM de cisteína e 5 mM de EDTA. Em seguida, foi realizada uma eluição inicial com o tampão de equilíbrio e, posteriormente, a coluna foi eluída com concentrações crescentes de NaCl preparadas no próprio tampão de equilíbrio. O fluxo da coluna foi mantido em 60 mL h⁻¹ e foram coletadas frações de 1,0 mL. A presença dos polissacarídeos sulfatados nas frações foi monitorada através da atividade metacromática pela reação com o azul dimetil dimetileno (DMB) e teor de açúcar total pela técnica de Dubois (Dubois et al., 1956).

2.4. Descapsulação dos cistos e obtenção dos náuplios de artêmias

Os náuplios de artêmia foram obtidos a partir de cistos desidratados que foram re-hidratados com água doce, sob aeração constante, durante aproximadamente 1h e, posteriormente, foram lavados com hipoclorito de sódio comercial por 30 segundos para a remoção do corion. Em seguida, os cistos descapsulados foram imediatamente lavados com água corrente em abundância para a completa remoção do hipoclorito de sódio. Os cistos descapsulados foram incubados em um recipiente de 1 L com água salgada com 35 g/L de cloreto de sódio, temperatura de 25 ± 2°C, aeração constante e iluminância de aproximadamente 1.000 Lux.

2.5. Teste de estresse salino

Após a eclosão, os náuplios foram transferidos para uma microplaca de poço profundo composta por 96 poços com 2 mL de volume. Em cada poço foram distribuídos 10 indivíduos, divididos em 3 tratamentos com diferentes concentrações (0,5; 1,0; 2,0 mg L⁻¹) dos polissacarídeos brutos e purificados, com sete repetições, e um controle sem a presença dos polissacarídeos. Os náuplios foram então submetidos a um estresse osmótico em solução supersaturada com 350 g/L de NaCl. No decorrer do estresse que durou quatro horas os indivíduos vivos foram contados a cada hora para verificação da sobrevivência.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Fracionamento dos Polissacarídeos Sulfatados

A cromatografia em coluna de troca iônica de DEAE-celulose dos polissacarídeos sulfatados brutos extraídos da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* (Figura 1) mostrou que foram eluídas duas frações, uma com 0,5 e outra com 0,7 M de NaCl, sendo que a maior atividade metacromática e o maior teor de açúcar foram observados na fração eluída com 0,5 M de NaCl.

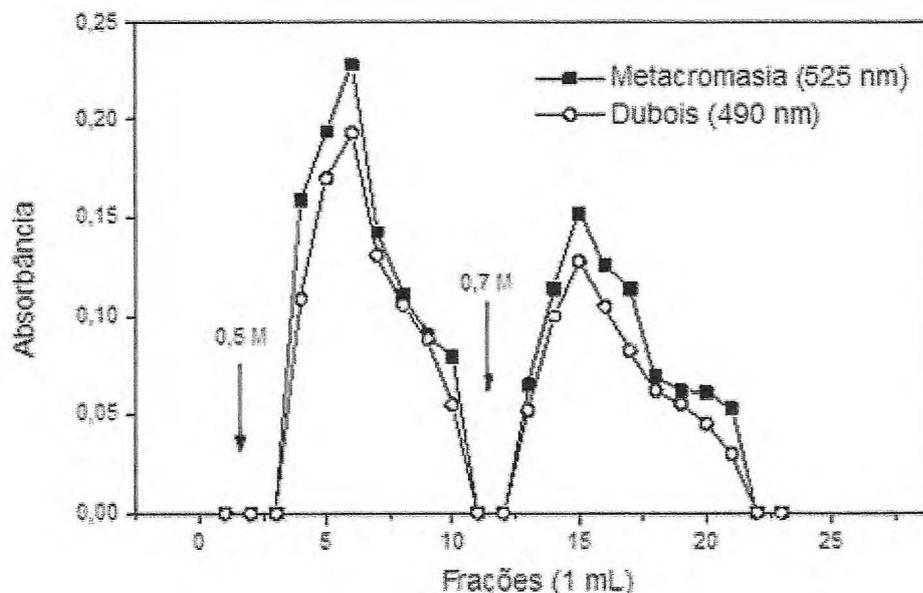


Figura 1: Cromatografia dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* em coluna de troca iônica DEAE-celulose.

A cromatografia em coluna de troca iônica de DEAE-celulose dos PS brutos extraídos da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* resultou em quatro frações que foram eluídas da coluna nas concentrações de 0,5; 0,7; 0,9 e 1,2 M de NaCl (Figura 2). A maior atividade metacromática foi observada na fração eluída com 1,2 M de sal, seguida das frações eluídas com 0,5; 0,7 e 0,9 M de NaCl. Quanto ao teor de açúcar, a relação entre a atividade metacromática e o teor de açúcar foi maior na fração eluída com 1,2 M de sal, enquanto a

menor relação foi observada na primeira fração (0,5 M). Este fato sugere que os PS da fração 1,2 M são mais sulfatados, o que justifica uma maior quantidade de sal para sua eluição da coluna de troca iônica.

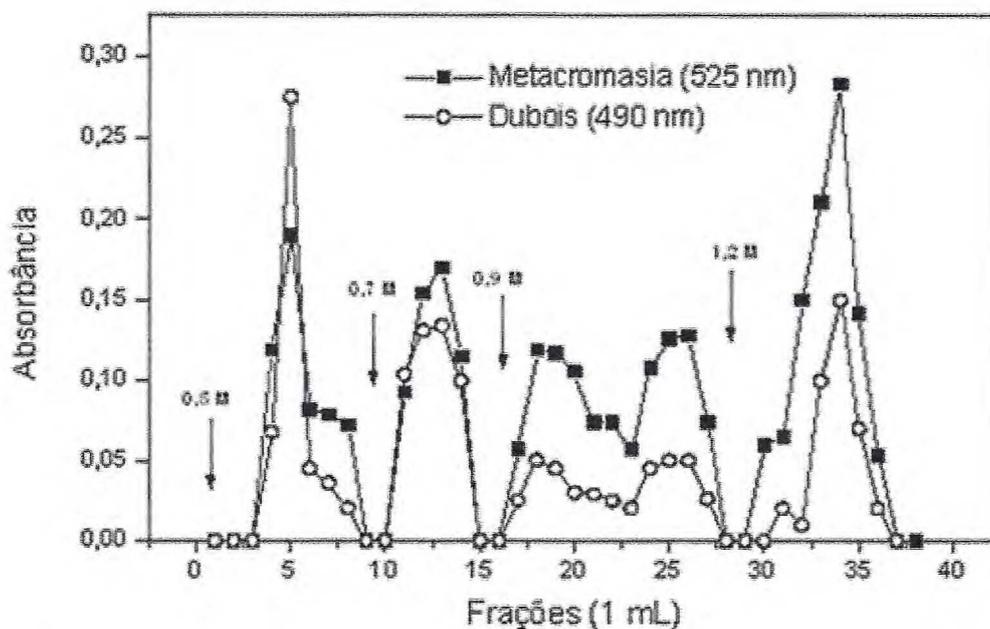


Figura 2: Cromatografia dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* em coluna de troca iônica DEAE-celulose.

RODRIGUES (2006) fracionou os PS das algas marinhas vermelhas *Halymenia* sp e *H. pseudofloresia*, encontrando quatro e cinco frações, respectivamente. A quantidade de frações obtida da coluna de troca iônica também vai depender das concentrações de sal utilizadas na eluição da coluna. Desta forma, as algas do gênero *Halymenia* apresentam elevadas concentrações de PS, independente da concentração de sal utilizada na eluição da coluna de troca iônica. PONTES (2005) purificou os PS da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* em quatro frações (1.2; 1.4; 1.6; 1.8 M de NaCl), também em DEAE-celulose, e observou uma elevada presença de açúcar nas frações eluídas com as maiores concentrações de sal (1.4, 1.6 e 1.8 M). Entretanto, TORRES (2005) mostrou que o fracionamento da alga marinha vermelha *Champia feldmannii* apresentou quatro picos com maiores concentrações de açúcar nas primeiras frações, sendo principalmente nas eluições 0.7 e 1.2 M de NaCl, resultados bastante semelhantes ao do presente trabalho.

Após a cromatografia dos PS extraídos da macroalga marinha parda *Lobophora variegata*, foram obtidas quatro frações eluídas da coluna de troca iônica nas concentrações de 0,5; 0,7; 0,9 e 1,2 M de NaCl (Figura 3). A atividade metacromática e o teor de açúcar foram maiores nas frações eluídas com 0,7 e 0,9 M de NaCl, seguida da fração obtida com 0,5 M. A menor atividade metacromática foi observada na fração eluída com 1,2 M de NaCl, na qual foi detectado inclusive o menor teor de açúcar.

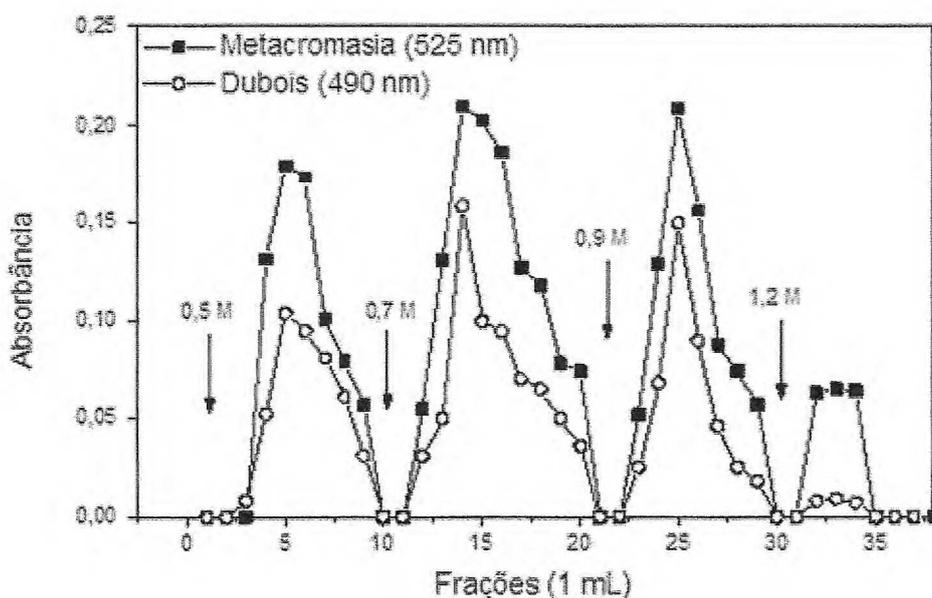


Figura 3: Cromatografia dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata* em coluna de troca iônica DEAE-celulose.

ALENCAR (2007) relata que o fracionamento dos PS extraídos da alga parda marinha *Lobophora variegata* resultou em seis frações, eluídas nas concentrações 0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4 e 1,6M de NaCl. As maiores quantidades de açúcar e metacromasia sempre foram observadas nas frações 0,5 e 0,7 M de NaCl. NONATO (2009) extraiu e purificou os PS de duas espécies de algas marinhas pardas, *Padina gymnospora* e *Padina* sp, obtendo na primeira seis frações eluídas nas concentrações 0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4 e 1,6 M de NaCl e, na segunda, apenas três (0,5; 0,7 e 1,2M de NaCl), e de acordo com o autor, nos dois fracionamentos, as maiores atividades metacromáticas e teores de açúcar também foram observadas nas primeiras frações, principalmente na fração eluída com 0,5 M de NaCl. LIMA (2007) fracionou os PS da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*, no mesmo tipo de coluna, e relatou um perfil metacromático no qual foram obtidas de três a quatro frações,

dependendo do número de extrações. Entretanto, a fração eluída com 0.5 M de NaCl apresentou a maior metacromasia e teor de açúcar em todas as extrações. Em estudos anteriores com a alga *S. Schroederi*, os PS foram fracionados por LEITE et al. (1998) através de cromatografia de troca iônica, utilizando 0.15; 0.3; 0.5; 0.7; 1.0; 1.5; 2.0 e 3.0 M de NaCl. Segundo os autores, a concentração de açúcar diferiu significativamente entre as frações, entretanto, como no presente trabalho, o pico com maior conteúdo de açúcar total foi na fração eluída com 0.5 M de NaCl.

3.2. Efeito dos PS na resistência de náuplios de artêmia submetidos ao estresse osmótico

Após a administração dos PS brutos, extraídos da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*, aos náuplios de artêmia submetidos ao estresse osmótico (Figura 4), pode-se observar que o único grupo que apresentou uma diferença significativa na sobrevivência em relação ao controle (25%) foi o que recebeu a maior quantidade de polissacarídeo ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$), para todas as frações administradas, com uma sobrevivência média em torno de 55% (Figura 4).

A exposição dos náuplios à fração eluída com 0,5 M da coluna de troca iônica resultou em diferença significativa da sobrevivência em relação ao controle, quando foram utilizadas a menor e maior concentração, com taxas de sobrevivência média em torno de 50 e 67%, respectivamente. Após a administração da fração 0,7 M de NaCl, somente os náuplios que receberam as maiores quantidades de polissacarídeos ($1,0$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$) apresentaram sobrevivências com diferença significativa à observada no controle com, aproximadamente, 55 e 63% respectivamente.

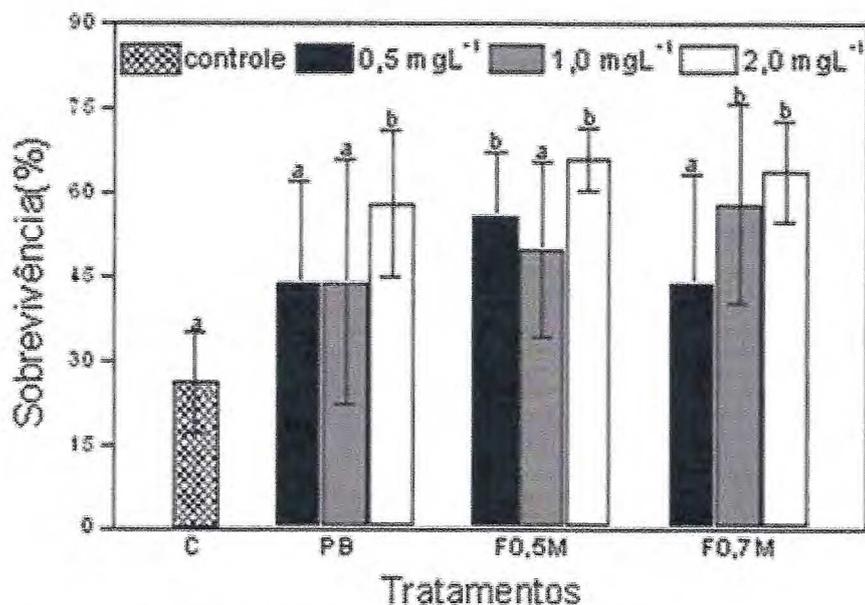


Figura 4: Sobrevivência de náuplios de artêmia submetidos a estresse salino na presença e ausência dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*. Letras diferentes sobre as barras de erro indicam diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,5$).

Quando foram utilizados os PS brutos extraídos da alga marinha vermelha *Solieria fliformis* e suas frações purificadas em coluna de troca iônica durante o estresse osmótico submetido aos náuplios de artêmia, as sobrevivências foram significativamente superiores as observadas no controle, com exceção da fração eluída com 0,9 M de sal que apresentou sobrevivência de apenas 35% (Figura 5).

As sobrevivências médias tanto dos PS brutos quanto das frações eluídas com 0,5; 0,7 e 1,2 M de NaCl não apresentaram diferenças significativas nem entre si, nem entre as concentrações testadas, embora seja observada uma ligeira tendência à redução da sobrevivência em concentrações mais elevadas (Figura 5).

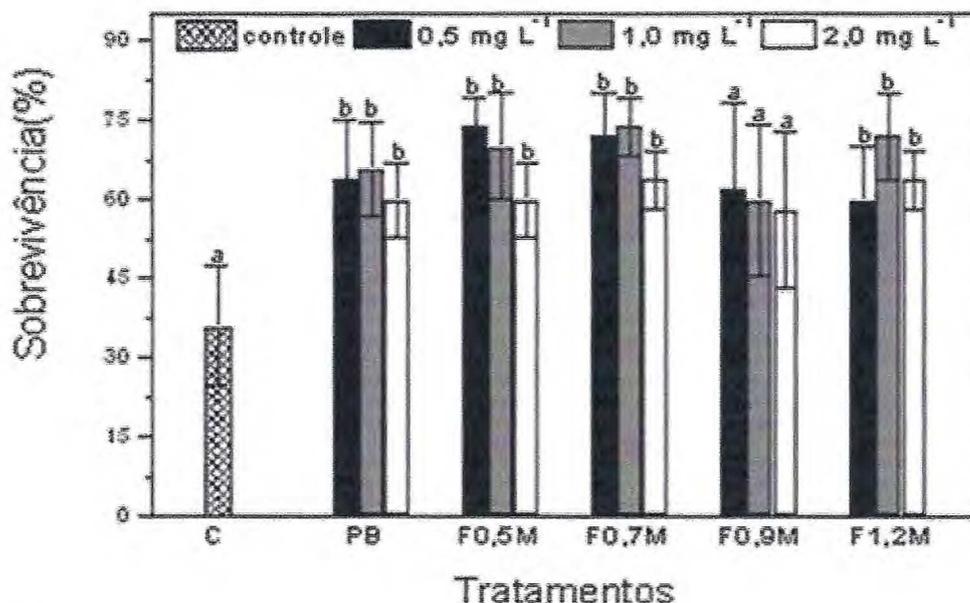


Figura 5: Sobrevivência de náuplios de artêmia submetidos a estresse salino na presença e ausência dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. Letras diferentes sobre as barras de erro indicam diferença significativa em relação ao controle ($P < 0,5$).

Após a exposição dos náuplios de artêmia aos PS brutos extraídos da alga marinha parda *Lobophora variegata* durante o estresse osmótico, podemos observar que somente os que receberam as menores concentrações apresentaram sobrevivências com diferença significativa para o controle, com taxas médias de sobrevivência 70 e 52,5%, respectivamente enquanto a taxa média de sobrevivência do controle foi de apenas 25%. Resultados bem semelhantes foram obtidos após a administração da fração eluída com 0,7 M de sal, cujas sobrevivências dos náuplios foram de 60 e 52% para as concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de Ps, respectivamente. No caso da administração da fração 0,5 M, todas as concentrações resultaram em sobrevivências significativamente superiores as observadas no controle e sem diferenças entre si, com uma taxa média de 54,5%. Já no caso da administração das frações 0,9 e 1,2 M, apenas a concentração mais baixa (0,5 mg L⁻¹) apresentou bons resultados de sobrevivências em relação ao controle com uma taxa de sobrevivência média de aproximadamente 64 e 60%, respectivamente.

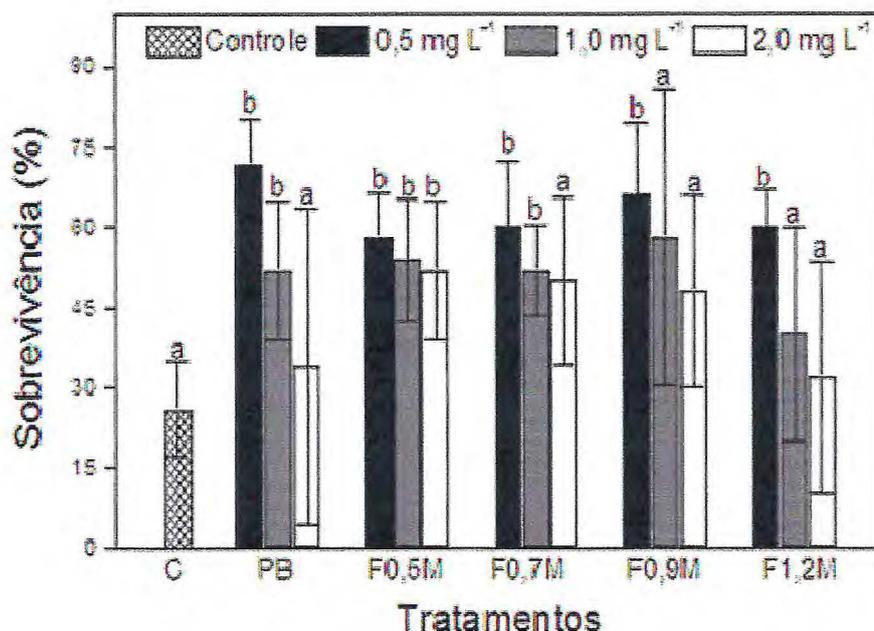


Figura 6: Sobrevivência de náuplios de artemia submetidos a estresse salino na presença e ausência dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Lobophora variegata*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística em relação ao controle ($P < 0,5$).

Estudos envolvendo imunostimulantes na aquicultura se traduzem como a melhor ferramenta para aumentar a sobrevivência de camarões (AZAD et al., 2005). O uso de polissacarídeos sulfatados em cultivos experimentais vem reduzindo o estresse sofrido por peixes e camarões. Barroso et al. (2007) observaram que pós-larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* imersas em determinada concentração dos PS brutos da alga marinha vermelha *Botriocladia occidentalis* ficaram mais resistentes ao manejo, aumentando a taxa de sobrevivência no final do experimento.

Rodrigues (2006) relatou um aumento significativo na sobrevivência de camarões *L. vannamei* submetidos a um banho de imersão com 1.0 mg L⁻¹ dos PS brutos da alga *H. pseudofloresi* durante o período de estresse realizado através da supressão da renovação da água dos cultivos.

De acordo com Rodrigues et al. (2009), a adição de diferentes doses de PS brutos extraídos da alga marinha parda *Lobophora variegata* na água de cultivo de alevinos revertidos de tilápia (*Oreochromis niloticus*), submetidos a diferentes salinidades, não surtiram efeitos na taxa de sobrevivência dos animais. Já Araújo (2006) administrou os PS

brutos extraídos da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* em pl's de tilápias *O. niloticus* submetidas à reversão sexual e observou que os peixes apresentaram maior sobrevivência quando expostos a dosagem de 1.0 mg L^{-1} .

Alguns trabalhos relatam a eficiência da administração dos PS extraídos das algas marinhas no aumento da resistência de camarões em situações de estresse ou de contaminação por patógenos, sendo mais uma ferramenta na prevenção de doenças infecciosas. De acordo com Chotigeat et al. (2004), após a administração oral do fucoidam extraído da alga parda *Sargassum polycystium*, foi verificado um aumento da sobrevivência do camarão negro *Penaeus monodon* infectado pelo vírus causador da mancha branca (WSSV). Maiores taxas de sobrevivência também foram observadas por Huang et al. (2006) em camarões *Fenneropenaeus chinensis*, infectados pela bactéria *Vibrio harveyi*, quando alimentados com dietas suplementadas com estes mesmos PS. Fu et al. (2007) utilizaram diferentes vias (oral, imersão e injeção) para administrar os PS da alga marinha vermelha *Gelidium amansii* em camarões da espécie *L. vannamei* infectados com a bactéria *Vibrio alginolyticus* sendo que a administração por via oral resultou no melhor resultado contra a infecção pelo patógeno. Lima (2007) relatou que administração dos PS da alga parda *S. schroederi* a juvenis de *L. vannamei*, via imersão, resultou em uma maior resistência dos animais no tratamento com a concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Segundo Tinman et al. (2000), híbridos de tilápia (*O. aureus x O. niloticus*) infectados com *Streptococcus difficile* e alimentados com ração suplementada com peptídeo glucano, nas doses mais baixas, apresentaram uma melhor sobrevivência. Itami et al. (1998) relatou que o uso de polissacarídeos não sulfatados, como os β -glucanos, também é capaz de reduzir o estresse em camarões, *Penaeus japonicus*, em diversas fases de crescimento. Os autores observaram um aumento significativo nas taxas de sobrevivência dos camarões quando o glucano foi administrado por um período mais prolongado. Park; Jong (1996) administrou, via oral, β -glucanos em tilápias, *O. niloticus*, melhorando a taxa de crescimento em relação ao controle sem a presença do polissacarídeo. De acordo com Farias et al. (2004) a incorporação das D-galactanas sulfatadas obtidas da alga marinha vermelha *B. occidentalis* na ração de tilápias do Nilo, durante o processo da reversão sexual utilizando alta densidade de estocagem como fator estressante, resultou em um aumento significativo no peso dos peixes quando foi administrada a concentração de $0,1 \text{ mg g}^{-1}$. De acordo com Cantelle (2009) que avaliou o efeito dos PS da macroalga *Gracilaria birdiae* incorporados na ração de camarões

L. vannamei infectados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), tendo observado um aumento significativo no consumo alimentar, resultando no aumento de peso dos camarões.

Diante do exposto, a utilização de náuplios de artêmia em ensaios para avaliar o efeito de PS de algas marinhas na resistência ao estresse é uma maneira prática e rápida de selecionar espécies que produzem moléculas com maior potencial para o uso na aquicultura, já que a utilização de animais adultos é sempre mais trabalhosa e requer mais espaço, pois o número de réplicas é fundamental para a aplicação de uma boa análise estatística.

4. CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho foi possível concluir inicialmente que a coluna de troca iônica foi eficiente na separação dos polissacarídeos sulfatados brutos das macroalgas marinhas *Gracilaria birdiae*, *Solieria filiformis* e *Lobophora variegata*.

Com relação ao teste de estresse osmótico, podemos concluir que, de uma maneira geral, a administração dos PS brutos e suas frações purificadas aos náuplios resultou em um aumento da sobrevivência em relação ao controle. Assim, este teste se constitui numa técnica simples e rápida para a prospecção de potenciais compostos imunoestimulantes.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, D. B. **Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora Variegata***. 2007. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- ANDREWS J.H., HARRIS R.F. (1986) **r and K-selection and microbial ecology**. Marshall K.C., Ed Adv Microb Ecol, New York: Plenum Press. 9:99-144
- ATHUKORALA, Y. et al. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 09, p. 1711-1716, 2007.
- ASSAD, L.T.; BURSZTYN, M. **Aqüicultura no Brasil: bases para o desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq/Ministério de Ciência e Tecnologia, 2000. 33-72p.
- AZAD, I.S.; PANIGRAHI, A.; GOPAL,C.; PAULPANDI, S.; MAHIMA, C.; RAVICHANDRAN, P. **Routes of immunostimulation vis-à-vis survival and growth of *Penaeus monodon* postlarvae**. *Aquaculture*, v.248, p.227-234, 2005.
- BARROSO, F.E.C.; RODRIGUES, J.A.G.; TORRES, V.M.; SAMPAIO, A.H.; FARIAS, W.R.L. Efeito do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* nas pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.38, n.1, p.58-63, Mar 2007.
- BARBIERI, R.C.J. e OSTRENSKY, A.N. **Camarões marinhos – Engorda**. 1. ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 352p.
- BOISSON-VIDAL, C. et al. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs of the Future**, v. 20, n. 12, p. 1237-1249, 1995.
- CAMPA-CÓRDOVA, A. I. et al. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulfated polysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 12, n. 04 p. 353-366, 2002.
- CHOTIGEAT, W.; TONGSUPA, S.; SUPAMATAYA, K.; PHONGDARA, A. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v.233, p.23-30, 2004.

COSTA-PIERCE, B.A. Ecology as the paradigm for the future of aquaculture. In: COSTA-PIERCE, B.A. (Ed.) **Ecological aquaculture: the evolution of the blue revolution**. Oxford: Blackwell Pub. 2002. p. 339-372.

FARIAS, W. R. L. et al. Enhancement of growth in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from marine algae. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, número especial, p. 189-195, 2004.

FONSECA, R. J. C.; OLIVEIRA, S. N. M. C. G.; MELO, F.R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MOURÃO, P. A. S. **Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities**. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 99, n. 3, p. 539-545, 2008

FU, Y.W.; HOU, W.Y.; YEH, S.T.; LI, C.H.; CHEN, J.C.; The immunoestimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administration on shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**. v.22, n.6, p.673-685, 2007.

GANDY et al., 2007 R.L. GANDY, T.M. SAMOCHA, M.P. MASSER, J.M. FOX, S.A.M. ALI, D.M. GATLIN III and M. SPEED, **The effect of unilateral eyestalk ablation and diet on the reproductive performance of wild-caught *Farfantepenaeus aztecus* (Ives, 1891) using a closed recirculating maturation system**, *Aquac. Res.* 38 (2007), pp. 580–587.

H.B. NADER, C.C. LOPES, H.A. ROCHA, E.A. SANTOS and C.P. DIETRICH, **Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities**, *Curr Pharm Des* 10 (2004), pp. 951–966.

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 tremophilum*. **Aquaculture**. Amsterdã, v. 164, p. 277-288, 1998.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 3.ed. Jundiaí: [s.n], 1999.

LEE, Y. K. et al. **Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus merguensis* by feeding *Spirulina platensis***. *Journal of Applied Phycology*, v. 15, n. 04, p. 279-287, 2003.

LIMA, P. C. W. C. **Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum shroederi* sobre o aumento da resistência do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* submetido a situações de estresse.** 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

McEVOY, L.A. and SARGENT, J.R., 1998. **Problems and techniques in live prey enrichment. Proceedings of the live feeds session. *Aquaculture Canada* 98**, pp. 12–16.

MILEŠ, D.J.C.; POLCHANA, J.; LILLEY, J.H.; KANCHANAKHAN, S.; THOMPSON, K.D.; ADAMS, A. **Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture*, v.195, p.1-15, 2001.**

M. ZUBIA, D. ROBLEDO and Y. FREILE-PELEGRIN, **Antioxidant activities in tropical marine *J Appl Psychol* 19 (2007)**, pp. 449–458.

NAESSENS et al., 1997, **Maturation performance of *Penaeus vannamei* co-fed *Artemia* biomass preparations, *Aquaculture* 155 (1997)**, pp. 87–101.

NONATO JUNIOR, R. **Utilização dos polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas do gênero *Padina* (ADANSON, 1763) como ferramenta de diferenciação de espécies.** Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

PARK, H.H; JEONG, H.D. **Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* in tilapia (*O. niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharidae. *Aquaculture*, Amsterdã, v. 143, n.3, p. 135-143, 1996.**

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

RAA, J. **The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds.** In: AVANCES EM NUTRICIÓN ACUÍCOLA. MEMORIAL DEL SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA. 5., 2000, Yucatan. Anais eletrônicos... Yucatan: Mérida, 2000.

RODRIGUES, J. A. G. **Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e seu efeito imunoestimulante no camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.** 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

RODRIGUES, J.A.G.; SOUSA, J. J.; LIMA, P.C.W.C.; LOURENÇO, J.A.; FARIAS, W.R.L. Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Halymenia pseudofloresia* mediante estratégia profilática. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, n.1, p.71-78, 2009.

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

SORGELOOS, P., DHERT, P. & CANDREVA, P. 2001. Use of brine shrimp, *Atemia* spp., in marine fish larviculture. **Aquaculture**, 2001: 147-159.

S. Koyanagi, N. Tanigawa, H. Nakagawa, S. Soeda and H. Shimeno, **Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities**, *Biochem Pharmacol* 65 (2003), pp. 173-179.

SORGELOOS, P., TANDLER, A. and VAN STAPEN, G., 2003. Preface: 3rd fish and shellfish larviculture symposium. **Aquaculture** 227, pp. 3-7.

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

TACON, A.J. 2003. **Aquaculture trend production analysis**. In: Review of the State of the World Aquaculture. *Fao Fisheries Circular*, 886(2): 5-29.

TINMAN, S; KELVIN, F; CARVALHO-FILHO, J. Effect of long-term oral administration of peptidoglycan (PG- Ajinomoto product) on growth rate and imunoestimulation response of hybrid tilapia (*O. aureus X O. niloticus*). **International Symposium on Tilapia Aquaculture**. Rio de Janeiro, v.2, p. 524-532, 2000.

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

V.P. MEDEIROS, K.C. QUEIROZ, M.L. CARDOSO, G.R. MONTEIRO, F.W. OLIVEIRA and S.F. CHAVANTE *et al.*, **Sulfated Lobophora** *Biochemistry (Mosc)* 73 (2008), pp. 1018-1024.

WOUTER et al., 2002 R. WOUTER, B. ZAMBRANO, M. ESPIN, J. CALDERON, P. LAVEN and P. SORGELOOS, Experimental broodstock diets as partial fresh food substitutes in white shrimp *Litopenaeus vannamei* B, **Aquac. Nutr.** 8 (2002), pp. 249–256.

ZHANG, H. J. et al. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate polymers**, v. 71, n. 03, p. 428-434, 2008.