



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

DESEMPENHO ZOOTÉCNICO, ENZIMAS DIGESTIVAS E
IMUNOCOMPETÊNCIA EM CAMARÕES *Litopenaeus vannamei*
ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM EXTRATO
DE POLISSACARÍDEOS DA MICROALGA *Porphyridium cruentum*

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para a
obtenção do título de Doutor em
Aquicultura.**

Orientadora: Débora Machado Fracalossi
Co-orientador: Roberto Bianchini Derner

RENATA ÁVILA OZÓRIO

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ozório, Renata Ávila

Desempenho zootécnico, enzima digestivas e imunocompetência em camarões marinhos alimentados com dieta suplementada com extrato de polissacarídeos da microalga *Porphyridium cruentum* / Renata Ávila Ozório ; orientadora, Débora Machado Fracalossi ; co-orientador, Roberto Bianchini Derner. - Florianópolis, SC, 2013.
101 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. *Litopenaeus vannamei*. 3. polissacarídeos sulfatados. 4. dieta. 5. imunestimulação.
I. Machado Fracalossi, Débora. II. Bianchini Derner, Roberto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Desempenho zootécnico, enzimas digestivas e imunocompetência em
caracáes *Litopenaeus vannamei* alimentados com dieta suplementada
com extrato de polissacarídeo da microalga *Porphyridium cruentum*.**

Por

RENATA ÁVILA OZÓRIO

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Débora Machado Fracalossi – *Orientadora*

Dr. Carlos Peres da Silva

Dr. Paulo César Oliveira Vergne de Abreu

Dr. Walter Quadros Seiffert

Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias

Ao meu esposo Roberto, meu maior incentivador.

Ao meu filho Francisco, luz da minha vida.

Aos meus pais Lúcia e Dino e minha irmã Fabiana, a base de tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, porque sem Ele eu não chegaria a lugar nenhum;

Aos meus pais, Lúcia e Dino; e a minha irmã Fabiana, pelo amor, carinho e incentivo constantes, eu amo vocês;

Aos meus enteados Luisa e Rafael; e a minha norinha Camila pela convivência amorosa;

A minha sogra Terezinha, pelo incentivo na conclusão deste trabalho;

Aos meus sobrinhos, Pedro Henrique, Alice, Frederico e Rodrigo por encherem a minha vida de cor e alegria; e aos familiares que mesmo distantes estiveram torcendo por mim;

Aos amigos queridos, parte da minha história desde o tempo do mestrado no CAL: Eunice, Tatiana, Ana Cristina, Jefferson, Roberta; e a Marcela amiga desde o tempo da graduação, vocês moram no meu coração;

A Silvana e a Sabrina, minhas irmãs de alma;

A minha orientadora Débora Machado Fractalossi pelo apoio e orientação;

Aos professores do Curso de Pós-graduação pelos ensinamentos, em especial à professora Margherita Anna Antônia Maria Barraco por esclarecer tão pacientemente as minhas dúvidas sobre imunologia de crustáceos;

Ao professor Walter Quadros Seiffert por permitir a realização do trabalho no LCM, apoiando com o espaço físico e os animais usados na pesquisa.

Ao professor Carlos Peres Silva e ao colega Daniel Alexandre pelas contribuições nas análises bioquímicas;

Ao Carlito, competente secretário do programa de Pós-graduação em Aquicultura, sempre fazendo o melhor pelos alunos e pelo Curso;

Aos professores que gentilmente aceitaram fazer parte da banca avaliadora deste trabalho;

Aos colegas de pós-graduação, companheiros queridos de sala de aula;

Aos colegas de trabalho do LCME: Avani, Deise, Eduardo, Eliana e Luciano e ao professor André Avelino Pasa pelo apoio para que eu concluísse esta etapa;

Aos funcionários do LCM, Carlos, Dimas, Davi e Iلسon; e aos alunos Bruna Suede Góes, Rodrigo Viana Dias, Vinícius Figueiredo dos Santos e Mônica Jeremias Lúcio, pelo apoio técnico na execução do trabalho;

Ao Rafael Garcia Lopes por ser meu braço direito durante todo o experimento, sem palavras para agradecer;

Ao Felipe do Nascimento Vieira, Bruno Correa da Silva e Norah Constanza Bolivar pelo suporte na coleta da hemolinfa, na infecção dos animais e nas análises hemato-imunológicas;

Ao José Luiz Pedreira Mourão e ao Frank Belettini pelas contribuições no planejamento dos experimentos; e ao Rodrigo Schweitzer pela ajuda nas análises estatísticas;

Ao amigo Felipe Vilani (Alemão) pelas belíssimas fotografias que enriqueceram a minha apresentação.

A Samya Campana pelas inúmeras vezes que revisou e formatou a minha Tese.

Ao meu amado filho Francisco, que traz luz e alegria a minha vida, que me transformou em uma pessoa melhor! Filho te amo com toda a minha alma!

Para encerrar um agradecimento especial ao meu esposo Roberto, sempre ao meu lado, incondicionalmente. Nos momentos mais difíceis, que não foram raros nestes últimos anos, sempre me fez acreditar que seria capaz de chegar ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Este período Roberto nos mostrou a verdade sobre o nosso relacionamento: nosso nó ninguém desata, somos uma família e somos unidos pelo amor e pela admiração que temos um pelo outro. Quero estar ao teu lado e com os “nossos filhos” em muitos outros projetos, para o resto da minha vida!

A todos que de alguma maneira fizeram parte desta caminhada, muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A suplementação oral do extrato bruto de polissacarídeos sulfatados, obtido da microalga *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta), foi avaliada sobre o ganho em peso, sobrevivência, parâmetros imunológicos e perfil das enzimas digestivas em juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. O extrato bruto de polissacarídeo sulfatado foi adicionado em diferentes concentrações 0%, 0,5%, 1%, 1,5% e 2% a uma ração comercial (proteína bruta 40%; extrato etéreo 7,5%), oferecida duas vezes por dia para 2000 camarões com peso médio inicial de $6,6 \pm 0,2$ g. A cada dez dias, os animais eram pesados e eram coletadas amostras de hemolinfa - para monitoramento das variáveis imunológicas - e de intestinos, para avaliação do perfil de enzimas. Após 30 dias de alimentação, os animais ($13,5 \pm 0,8$ g) foram reorganizados em um novo experimento, onde foram desafiados com o patógeno *Vibrio alginolyticus*, na concentração 5×10^6 UFC/mL, por injeção (25 μ L) aplicada no primeiro segmento dorsal. Os animais do grupo controle receberam injeção de solução salina estéril. A sobrevivência e os parâmetros hemato-imunológicos (contagem total de hemócitos, CTH, e atividade da fenoloxidase, PO) foram avaliados ao final de 48 h. A suplementação dietética registrou os maiores ganhos em peso na faixa de 1% a 1,5% de suplementação. A composição corporal dos animais não foi afetada pela suplementação. Similarmente, não foi observada alteração nas atividades das carboidrases e proteinases no hepatopâncreas com as diferentes doses testadas. Entretanto, registrou-se um aumento da atividade enzimática ao longo do intestino, sugerindo o carreamento das enzimas digestivas produzidas no hepatopâncreas para este órgão. Antes do desafio com o patógeno, apenas a atividade da PO apresentou um aumento proporcional à suplementação dietética com o polissacarídeo sulfatado. Após o desafio, os animais alimentados com a dieta contendo 1% de polissacarídeo apresentaram a maior sobrevivência (90%) em 48 h, enquanto que os animais do grupo controle, sem suplementação, assim como os alimentados com dieta contendo 2% de extrato de polissacarídeo, apresentaram sobrevivência de aproximadamente 63%. Após o desafio a CTH diminuiu em todos os tratamentos, mas continuou sendo mais elevada nos animais que receberam a dieta suplementada com o extrato de polissacarídeo. Em contraste, a atividade da PO aumentou em todos os tratamentos e continuou sendo maior naqueles suplementados com polissacarídeo

sulfatado. De acordo com os resultados obtidos sugere-se uma faixa de suplementação dietética de extrato de polissacarídeos sulfatados entre 1% e 1,5%. Dentro desta faixa, otimiza-se o ganho em peso, resistência à infecção, imunoestimulação e atividade das enzimas digestivas.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, *Porphyridium cruentum*, polissacarídeos sulfatados, *Vibrio alginolyticus*, imunoestimulação, enzimas digestivas.

ABSTRACT

Oral supplementation of crude extract of sulfated polysaccharides, obtained from microalgae *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta), was evaluated on the weight gain, survival, immunological parameters and profile of digestive enzymes in juvenile marine shrimp *Litopenaeus vannamei*. The crude extract of sulfated polysaccharide was added at different concentrations 0%, 0.5%, 1%, 1.5% and 2% to a commercial diet (40% crude protein, ether extract 7.5%), offered twice a day for 2000 shrimps with an average initial weight of 6.6 ± 0.2 g. Every ten days, the animals were weighed and samples were collected from hemolymph - for monitoring immunological variables - and intestines, for assessing the profile of enzymes. After 30 days of feeding, animals (13.5 ± 0.8 g) were rearranged in a new experiment where they were challenged with the pathogen *Vibrio alginolyticus* in a concentration 5×10^6 CFU / mL for injection (25 μ L) applied on the first dorsal segment. The control animals received injections of sterile saline. Survival and hemato-immunological parameters (total count of hemocytes, CTH, and phenol oxidase activity, PO) were evaluated at the end of 48h. Dietary supplementation recorded the largest gains in weight in the range of 1% to 1.5% supplementation. The body composition of the animals was not affected by supplementation. Similarly, no changes were observed in the activities of carbohydrases and proteinases in the hepatopancreas with the different doses tested. However, there was an increase in enzyme activity along the intestine, suggesting the conduction of digestive enzymes in hepatopancreas for this organ. Before challenge with the pathogen, only PO activity showed an increase proportional to dietary supplementation with sulfated polysaccharide. After challenge, the animals fed the diet containing 1% polysaccharide showed the highest survival (90%) in 48h, while the control animals without supplementation, as well as a diet containing 2% extract polysaccharide, showed a survival rate of approximately 63%. After challenge CTH decreased in all treatments, but remained higher in the animals fed the diet supplemented with the extract polysaccharide. In contrast, the PO activity increased in all treatments and remained higher in those supplemented with sulfated polysaccharide. According to the results obtained suggest a range of dietary supplementation of sulfated polysaccharides extract from 1% to 1.5%. Within this range, optimizes

the gain in weight, resistance to infection, immune stimulation and activity of digestive enzymes.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Porphyridium cruentum*, sulfated polysaccharides, *Vibrio alginolyticus*, immunostimulation, digestive enzymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1 _____	
Figura 1 - <i>Porphyridium cruentum</i>	30
Capítulo 2 _____	
Figura 2. Deslocamento da atividade das enzimas digestivas, proteinases (A, C, D) e α -amilase (B) no hepatopâncreas (H), intestino anterior (A), médio (M) e posterior (P) no camarão branco, quando alimentado com dietas suplementadas com níveis crescentes do extrato bruto de polissacarídeo sulfatado da microalga <i>Porphyridium cruentum</i>	48
Figura 3. Deslocamento da atividade das enzimas digestivas, carboidrases (A, B, C e D) no hepatopâncreas (H), intestino anterior (A), médio (M) e posterior (P) no camarão branco, quando alimentado com dietas suplementadas com níveis crescentes do extrato bruto de polissacarídeo sulfatado da microalga <i>Porphyridium cruentum</i>	49

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 _____

Tabela 1. Ganho em peso e sobrevivência de juvenis de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dieta suplementada com diferentes concentrações de extrato bruto de polissacarídeo sulfatado da microalga *Porphyridium cruentum* por 30 dias..... 45

Tabela 2. Composição centesimal do músculo do camarão branco após 30 dias de alimentação com dietas suplementadas com diferentes concentrações de extrato bruto de polissacarídeo sulfatado da microalga *Porphyridium cruentum* (g kg⁻¹ peso úmido) 45

Capítulo 3 _____

Tabela 1. Respostas imunológicas de *L. vannamei* (13,3 ±0,3 g) antes (0 h) e após infecção (48 h) com *Vibrio alginolyticus* (5,0 x 10⁶ CFU)..... 65

Tabela 2. Efeito da suplementação dietética crescente do extrato bruto de polissacarídeos da microalga *Porphyridium cruentum* na sobrevivência de juvenis de *Litopenaeus vannamei* (13,3 ±0,3g) desafiados com *Vibrio alginolyticus* (5,0 x 10⁶ CFU) após 24 e 48 h ...66

SUMÁRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA	1
<u>CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	<u>21</u>
2.1 AQUICULTURA COM ÊNFASE NO CULTIVO DE <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i> ...	21
2.2 ENFERMIDADES E RESPOSTA IMUNE EM CRUSTÁCEOS	23
2.3 IMUNOESTIMULANTES	27
2.4 AS MICROALGAS COMO FONTE DE COMPOSTOS BIOATIVOS	28
2.5 A MICROALGA <i>PORPHYRIDIUM CRUENTUM</i> (RHODOPHYTA)	29
2.6 A ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DOS POLISSACARÍDEOS	31
JUSTIFICATIVA	34
OBJETIVOS	35
OBJETIVO GERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS.....	36
<u>CAPÍTULO 2.....</u>	<u>37</u>
<u>DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS ENZIMAS DIGESTIVAS EM CAMARÕES <i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i> ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM EXTRATO DE POLISSACARÍDEOS DA MICROALGA <i>PORPHYRIDIUM CRUENTUM</i></u>	<u>37</u>
RESUMO	38
ABSTRACT	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAIS E MÉTODOS	41
OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE POLISSACARÍDEOS.....	41
PREPARAÇÃO DAS DIETAS.....	41
MATERIAL BIOLÓGICO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	42
COLETA DE TECIDOS PARA ENSAIOS ENZIMÁTICOS	43
CONDIÇÕES DOS ENSAIOS ENZIMÁTICOS E DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	43
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
GANHO EM PESO, SOBREVIVÊNCIA E COMPOSIÇÃO PROXIMAL DO MÚSCULO. ...	44

DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS ENZIMAS DIGESTIVAS NO INTESTINO E HEPATOPÂNCREAS DO CAMARÃO BRANCO	47
CONCLUSÕES	50
AGRADECIMENTOS	51
REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO 2	51

CAPÍTULO 3 55

POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA MICROALGA *PORPHYRIDIVM CRUENTUM* COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA DE JUVENIS DE *LITOPENAEUS VANNAMEI* À INFECÇÃO POR *VIBRIO ALGINOLYTICUS* 55

RESUMO	56
ABSTRACT	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	60
OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	60
PREPARAÇÃO DAS DIETAS	61
CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	61
ENSAIO ALIMENTAR	61
DESAFIO COM <i>VIBRIO ALGINOLYTICUS</i>	62
PREPARO DO INÓCULO BACTERIANO	62
COLETA DA HEMOLINFA PARA PREPARAÇÃO DO SORO	62
AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS	63
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	64
RESULTADOS	64
CONTAGEM TOTAL DOS HEMÓCITOS	64
SOBREVIVÊNCIA	66
DISCUSSÃO	67
CONCLUSÕES	70
AGRADECIMENTOS	70
REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO 3	70

CONCLUSÕES GERAIS 75

CONSIDERAÇÕES FINAIS 77

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	79
APÊNDICE	89

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aquicultura com ênfase no cultivo de *Litopenaeus vannamei*

Segundo Jiang (2010), a redução dos estoques pesqueiros naturais é um problema relacionado à segurança alimentar e ao bem estar social mundial. O crescente déficit entre a quantidade de pescado capturado e a demanda de consumo tornou a aquicultura - o cultivo de qualquer animal aquático, como peixes, crustáceos e mariscos (FROTA, 2006) uma das alternativas mais promissoras para o fornecimento de alimento de excelente valor nutritivo (CAMARGO; POUHEY, 2005).

Segundo Hannesson (2003), esta atividade vem se desenvolvendo de forma notória nos últimos 20 anos. Dados da FAO (2012) demonstram que a produção de pescados girou em torno de 128 milhões de toneladas para o consumo humano, sendo que a aquicultura contribuiu com 47% dessa produção, um aumento de 7,5 % em relação ao ano de 2009.

Entre 1990 até 2010 a aquicultura mundial vem apresentando crescimento anual médio de 8,8%, sendo muito superior ao crescimento da indústria pesqueira oriunda da captura (3,2%) e àquele dos sistemas de produção de proteína de animais terrestres (2,8%), para o mesmo período (FAO, 2012).

Dados da FAO (2012) indicam a seguinte composição da produção aquícola mundial: 56,4% peixes de água doce (33,7 milhões de toneladas), 23,6% moluscos (14,2 milhões de toneladas), 9,6% crustáceos (5,7 milhões de toneladas), 6% peixes diádromos (3,6 milhão toneladas), 3,1% peixes marinhos (1,8 milhões de toneladas) e 1,4% de outros animais aquáticos (814. 300 toneladas). A produção aquícola excede a produção de captura para muitas das espécies, entre elas os camarões marinhos, onde 55% da produção total mundial são provenientes de aquicultura.

A produção mundial de crustáceos marinhos corresponde a 70,6% da produção total de crustáceos e é dominada pelo camarão branco *Litopenaeus vannamei*, sendo esta a espécie mais bem sucedida internacionalmente na aquicultura. Em 2010, foi responsável por 71,8% da produção mundial de todas as espécies de criação de camarões marinhos, dos quais 77,9% foram produzidos na Ásia e o restante produzido na América, continente de origem da espécie (FAO 2012).

Em 2010, entre as nações que atuaram na produção de *L. vannamei*, os países asiáticos foram responsáveis por 77,9% da produção o restante foi produzido nas Américas (FAO, 2012).

O *L. vannamei*, também conhecido como “Camarão Branco do Pacífico ou Camarão Cinza”, é uma espécie exótica ao litoral brasileiro. Sua distribuição natural vai desde as águas do oceano Pacífico na província de Sonora, México, até o sul de Tumbes no Peru (NUNES; MARTINS 2002). Esta é a única espécie de camarão marinho criado comercialmente no Brasil e isto se deve à boa adaptação, rusticidade e ao rápido crescimento em todas as fases do processo produtivo. As pós-larvas desta espécie aceitam facilmente rações e toleram uma ampla variação na salinidade da água (COSTA *et al.*, 2006). Além disso, este peneídeo apresenta uma alta aceitação nos mercados internacionais, devido à cor branca do músculo (NUNES, MARTINS, GESTEIRA, 2004).

No Brasil o *L. Vannamei* foi introduzido na década de 1980 e em meados de 1990, os laboratórios brasileiros passaram a dominar as tecnologias relacionadas à reprodução e produção de pós-larvas, iniciando a distribuição comercial e intensificando as validações tecnológicas nas fazendas de camarão (LIMA, 2007).

Os avanços tecnológicos relacionados ao cultivo de camarões, como o uso de aeradores e máquinas de despesca, o manejo do fundo do tanque, a alimentação e o processo de controle de qualidade, promoveram o desenvolvimento da carcinicultura (CAVALCANTI, 2003).

Em 2003, no Brasil foram produzidas 90.190 toneladas de camarão consolidando o Brasil como líder no hemisfério ocidental e como sexto maior produtor do mundo (ROCHA; RODRIGUES, 2004). Entretanto, o volume produzido começou a decair a partir de 2004, devido o aparecimento das enfermidades em particular a Mionecrose Infeciosa (IMNV), a qual rapidamente se espalhou pela região Nordeste, maior polo produtor.

Em janeiro de 2005, o Ministério da Agricultura do Brasil confirmou a presença do vírus da mancha branca na região de Laguna em Santa Catarina, sendo a primeira vez que o vírus foi registrado no Brasil. A mancha branca foi verificada em, pelo menos, cinco fazendas de camarões criados em cativeiros no estado de Santa Catarina (JURGENFELD, 2005).

A ocorrência de doenças como o a mancha branca rebaixaram o posto brasileiro de líder americano na produção de camarão em 2003 para um pouco atrativo 3º lugar, precedido pelo México e Equador.

Além disso, o Brasil perdeu a liderança mundial em termos de produtividade com perdas na produção na ordem de 40 mil toneladas entre o período de 2003 a 2005 (SEIFFERT *et al.*, 2006).

2.2 Enfermidades e Resposta Imune em Crustáceos

Na carcinicultura, enfermidade significa qualquer alteração adversa na saúde ou no desempenho dos camarões cultivados (NUNES; MARTINS, 2002).

O ambiente aquático é abundante em micro-organismos infecciosos, sendo extremamente fácil a transmissão de doenças, especialmente em condições de altas densidades. Quando há algum desequilíbrio no ambiente de criação, os camarões são expostos a agentes estressores, os quais, dependendo da intensidade, podem reduzir sua resposta imunológica, o que é determinante para o surgimento de doenças (VAN DE BRAAK *et al.*, 2002).

São considerados agentes estressores altas densidades de estocagem associado à baixa qualidade da água e a intensificação da produção os quais podem interferir de maneira conjunta ou individualmente no equilíbrio do ambiente (KAUTSKY *et al.*, 2000).

Mundialmente o crescimento do número de fazendas resulta em diminuição da qualidade do ambiente de cultivo e principalmente no surgimento de inúmeras doenças infecciosas, na sua maioria de origem viral, que limitam o desenvolvimento do setor e causam grande impacto na produção (KAUTSKY *et al.*, 2000; NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).

Dentre as viroses já relatadas em camarões, as que mais afetaram a carcinicultura nas Américas foram às causadas pelo vírus da necrose infecciosa e hematopoiética ou IHNV (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus), o vírus da síndrome de Taura ou TSV (Taura Syndrome Virus) e, mais recentemente, o vírus da mancha branca ou WSSV (White Spot Syndrome Virus), todos já diagnosticados no Brasil (NUNES; MARTINS, 2002; BUCHELI; GARCIA, 2005).

O WSSV foi diagnosticado em Santa Catarina em 2005, afetando substancialmente a produção de camarões no estado (MADRID, 2005). Entre as bactérias algumas espécies do gênero *Vibrio* são conhecidas como sendo patógenos oportunistas, causando grandes mortalidades nas larviculturas de camarões marinhos e em adultos em situação de estresse (LIU; CHEN, 2004).

As bactérias do gênero *Vibrio* podem ser encontradas livres ou associadas a organismos aquáticos nos mais diversos ambientes, tais como estuários, águas costeiras, sedimentos e tanques de produção aquícola (VIEIRA *et al.*, 2007). Bactérias são comuns na água do mar e podem se tornar um patógeno dentro do cultivo, dependendo das condições ecológicas do ambiente onde se encontram (SKJERMO, VADESTEIN, 1999).

Na literatura as principais espécies relatadas como patogênicas para crustáceos são: *Vibrio dansela* (SONG; CHENG; WANG, 1993), *Vibrio harveyi* (PASHARAWIPAS *et al.*, 2005), *Vibrio orientalis* (ABRAHAMA; PALANIAPPAN, 2004), *Vibrio alginolyticus* (VANDENBERGHE *et al.*, 1998).

Nos camarões, a septicemia causada por bactérias e mesmo às infecções internas localizadas é acompanhada por diferentes sinais clínicos como opacidade da musculatura abdominal, anorexia e cromatóforos expandidos (SONG, CHENG, WANG, 1993).

Para o controle das enfermidades bacterianas, os antibióticos são comumente utilizados, porém, o uso inapropriado desses quimioterápicos pode provocar a seleção de algumas cepas patogênicas resistentes (VÁSQUEZ *et al.*, 2005). Outro fator preocupante no uso de antibióticos e a sua acumulação no músculo dos animais cultivados o que dificulta a comercialização dos mesmos (COOK *et al.*, 2002). Importadores e consumidores, cada vez mais exigentes têm demonstrado aversão a produtos produzidos com antibióticos, desta forma, é grande o interesse da indústria camaroneira em evitar o uso de antibióticos para o controle de doenças, assim, novos métodos de controle de doenças devem ser desenvolvidos (SKJERMO; VADSTEIN, 1999).

Assim como todos os invertebrados, os crustáceos são dotados apenas de um sistema imune inato, não apresentando o sistema adaptativo, presente nos vertebrados. Este último caracteriza-se pela presença de uma infinidade de receptores e anticorpos altamente específicos e pela indução de células de memória, que garantem uma resposta de defesa extremamente eficiente e específica contra os mais diversos patógenos. Esta especificidade está ligada a uma linhagem celular denominada linfocítica, que ocorre somente nos vertebrados e que auxilia nos mecanismos de memória imunológica. A ausência desta linhagem celular nos invertebrados impossibilita o desenvolvimento de vacinas, limitando a possibilidade de prevenir e controlar infecções nestes animais (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Além da cutícula rígida, que funciona como uma barreira física protetora contra agressões e invasão de patógenos, a integridade

corpórea dos crustáceos é mantida por seu sistema imunológico, o qual está intimamente relacionado à hemolinfa. Assim como o sangue nos vertebrados, a hemolinfa é composta por uma fração celular, representada pelas células circulantes ou hemócitos, além de uma fração líquida, o plasma, que contém os fatores humorais. Os componentes humorais e celulares atuam em conjunto para a detecção e eliminação de agentes estranhos dos tecidos infectados, garantindo a sobrevivência dos crustáceos (BARRACO, 2004).

Portanto, as respostas imune-celulares dos crustáceos estão basicamente relacionadas às células da hemolinfa ou hemócitos. Estas respostas incluem a fagocitose de microrganismos, a formação de cápsulas e nódulos em torno de partículas estranhas e os mecanismos citotóxicos e/ou degradativos intracelulares, os quais são utilizados para inativar e eliminar os agentes invasores (SMITH; BROWN; HAUTON, 2003).

Muitas dessas moléculas microbicidas encontram-se armazenadas dentro de vesículas ou grânulos de certas populações de hemócitos, enquanto outras são produzidas e secretadas para a hemolinfa, atuando em diferentes cascatas imunológicas. Além de atuarem nas respostas de defesa, os hemócitos ainda participam no reparo de ferimentos, esclerotização da cutícula e no metabolismo e transporte de carboidratos.

A determinação dos hemogramas em crustáceos, que consiste na contagem total e diferencial dos hemócitos circulantes (THC e DHC, do inglês total hemocyte count e differential hemocyte count, respectivamente), funciona como um dos principais imunoparâmetros para expressar a condição de saúde destes animais (BACHERE, 2003; BARRACO, 2004).

A ativação do sistema imune inato depende do reconhecimento imediato de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês, pathogen associated molecular patterns) ou por proteínas de reconhecimento de padrão molecular (PRPs, do inglês, pattern-recognition proteins). Em crustáceos, estas moléculas podem estar na hemolinfa ou na superfície dos hemócitos. Após o reconhecimento, os hemócitos se ativam e desencadeiam uma série de respostas imunológicas como reações celulares e a produção e liberação de moléculas imuno-efetoras que levam à degradação dos agentes infecciosos (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

A atividade da enzima pró-fenoloxidase (PO) também é um parâmetro bastante utilizado em ensaios imunológicos em camarões,

indicador da situação do sistema de defesa frente a adversas condições ambientais, fisiológicas e de sanidade (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; SONG *et al.*, 2003).

A forma PO é uma oxidoreductase que catalisa duas reações sucessivas: a primeira, de hidroxilação de um monofenol a-difenol (atividade monofenoloxidásica) e, a segunda, de oxidação do -difenol a -quinona (atividade difenoloxidásica). A produção de o-quinonas resulta na síntese de melanina através de uma cascata de reações químicas intermediárias, sendo a maioria espontânea, não mediada por enzimas. A produção de quinonas leva também à esclerotização da cutícula dos camarões, fenômeno essencial nos períodos de muda (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1998). A melanização ocorre também durante a cicatrização de ferimentos em crustáceos, quando os hemócitos migram para o epitélio lesado e formam um tampão celular até que a nova cutícula seja reconstituída (CERENIUS; SÖDERHALL, 2004; BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Em relação ao papel imunológico do sistema proPO, sabe-se que esta via gera transitoriamente moléculas altamente tóxicas, como as quinonas, hemiquinonas e radicais livres como as próprias ROIs, uma vez que ocorre consumo de oxigênio molecular e que leva a destruição dos patógenos invasores (BARRACO; PERAZOLLO; ROSA, 2008). O pigmento escuro e insolúvel melanina parece ter uma atividade fungistática (Cerenius e Söderhäll, 2004), podendo ainda funcionar como scavenger de radicais livres (Nappi e Vass, 1993; Nappi e Ottaviani, 2000), minimizando assim os efeitos deletérios destas moléculas altamente tóxicas para o organismo do hospedeiro. Contudo, deve ser salientado que a melanina, per se, não é a molécula imunoefetora mais importante durante a ativação do sistema proPO, sendo os compostos citotóxicos intermediários os mais efetivos (NAPPI; VASS, 1993). Assim sendo, a melanização representa, mais especificamente, o final de um potente processo imunoefetor.

Apesar de apresentar um rico arsenal imunológico compoendo seu sistema imune, os camarões estão muito sujeitos a enfermidades nos cultivos. A busca por alternativas para melhorar a imunocompetência destes camarões desponta como uma alternativa interessante, uma vez que estes não podem ser vacinados (CANTELLI, 2009).

Diversos estudos demonstram que o fornecimento de substâncias imunostimulantes aos camarões pode melhorar os seus índices imunológicos, resultando em uma maior resistência à infecção por patógenos (WANG; XU; XIA, 2005, HUANG, ZHOU, ZHANG, 2006).

2.3 Imunoestimulantes

Segundo Bricknell e Dalmo (2005), os imunoestimulantes são importantes ferramentas com potencial para utilização na aquicultura como forma de minimizar perdas devido às doenças que acarretam prejuízos ao produtor. O imunoestimulante é um composto que modula o sistema imune aumentando a resistência do hospedeiro contra doenças que na maioria das circunstâncias são causadas por patógenos.

A imunoestimulação em crustáceos é profilática, promovendo uma ação no sistema imunológico não específico, ativando ou melhorando a vigilância e a reação contra ameaças de patógenos (SMITH; BROWN; HAUTON, 2003).

Segundo Skjermo *et al.* (2006), estimular o sistema de defesa não específico melhora o crescimento e a resistência a doenças, além de ser potencial medida para aumentar o controle microbiano em produções juvenis de peixes marinhos, crustáceos e moluscos.

O desejável numa imunoestimulação seria poder potencializar as defesas naturais do camarão sem custo fisiológico importante, elevando, por exemplo, o número de células imunológicas (hemócitos) e modulando os níveis das moléculas imunoefetoras e imunoreguladoras, de tal forma a deixar os animais numa condição ótima de imunocompetência para reagir com eficiência a uma eventual invasão por patógenos (BARRACCÒ; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Os imunoestimulantes são usualmente utilizados nos cultivos de camarões sob forma de banho (imersão dos animais), ou como suplemento na dieta, ou mais raramente sob forma de injeção (aparentemente mais eficaz) (BARRACO; PERAZOLLO; ROSA, 2008).

A vantagem da administração oral fica por conta do controle da dose administrada aos animais bem como na facilidade do manejo.

Uma variedade de polissacarídeos, de diversas fontes, pode ter habilidade de enriquecer o sistema imunológico, porém, os mais ativos são as β -(1,3)-glucanas, algumas vezes referenciadas como β -(1,3; 1,6)-glucanas, ou laminaranas (BOHN; BeMILLER, 1995).

Nos últimos anos cresceu o interesse científico na investigação e identificação de compostos oriundos de algas, com atividade biológica e aplicabilidade em vários ramos da ciência. Dentre estes compostos, os polissacarídeos extraídos de algas marinhas. Essas substâncias têm sido cada vez mais utilizadas na aquicultura, devido à grande variedade de parasitas, fungos, bactérias e vírus que afetam a produção dos

organismos aquáticos, causando grandes perdas econômicas (BOISSON-VIDAL, 1995; TINMAN; KELVIN; CARVALHO-FILHO, 2000).

2.4 As microalgas como fonte de compostos bioativos

As microalgas constituem um grupo de organismos microscópios fotossintetizantes com ampla distribuição no globo terrestre e elevada relevância ecológica (DERNER, *et al.*, 2006). Possuem diversos usos e aplicações sob diferentes áreas da ciência (PULZ; GROSS, 2004).

A partir da década de 1950 as microalgas começaram a ser utilizadas como fonte de alimento e de substâncias biologicamente ativas. Em 1960 seu uso foi levado à escala comercial com o gênero *Chlorella* e a partir de 1970 as microalgas foram destinadas à aquicultura, além de outros fins biotecnológicos (SPOLAORE *et al.*, 2006).

As microalgas possuem aplicações biotecnológicas em distintas áreas, podendo ser utilizada tanto a biomassa algal, seca ou úmida, para nutrição humana e animal, aquicultura e indústrias de biofertilizantes, como os produtos extraídos dela (PULZ; GROSS, 2004).

Para suprir as necessidades comerciais, o cultivo de microalgas está crescendo gradativamente no mundo inteiro, e tem sido realizado em larga escala, em sistemas fechados de produção fotossintética de biomassa, denominados fotobiorreatores; sistemas fechados de produção por nutrição heterotrófica, denominados fermentadores; ou em tanques, sistemas chamados “abertos” (LOURENÇO, 2006).

Estes microrganismos podem ser considerados relativamente de fácil cultivo, apresentando rápido crescimento e tolerância a fatores extremos (BORGES *et al.*, 2007).

Na alimentação humana e animal, as microalgas representam uma fonte suplementar de proteínas, carboidratos, ácidos graxos de elevada importância, como os da família ômega 3 e ômega 6, pigmentos naturais, como os carotenoides, vitaminas, entre outras substâncias capazes de enriquecer o valor nutricional dos alimentos e produzir efeitos promotores de saúde como melhora nas respostas imunes, fertilidade e melhor controle de peso (SPOLAORE *et al.*, 2006; DERNER *et al.*, 2006). As microalgas apresentam ainda atividades probióticas e imunomodulatórias, além de respostas de melhora na saúde e aparência externa dos animais (PULZ; GROSS, 2004; SPOLAORE *et al.*, 2006).

Considerando os aspectos relacionados à cadeia alimentar, as microalgas são de fundamental importância na aquicultura e especialmente na maricultura (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA., 2008). Representam importante fonte primária alimentar e aditivo na produção comercial de muitos organismos aquáticos, entre eles, larvas, juvenis e adultos de várias espécies de crustáceos, moluscos e peixes (BOROWITZA, 1997; BROWN *et al.* 1997). São importantes como fonte de alimentação direta e indireta na larvicultura (BECKER, 2008).

Outra função das microalgas na aquicultura é estabilizar e proporcionar melhoria na qualidade da água de cultivo, através da absorção de produtos nitrogenados tóxicos (amônia e nitrito) (LOURENÇO, 2006; BORGES *et al.*, 2007).

A ação de alguns componentes bioquímicos excretados pelas microalgas nos meios de cultura, como efeitos probióticos, estimulação da imunidade e combate a bactérias patogênicas têm sido sugeridos, embora não eficientemente entendidos (SPOLAORE *et al.*, 2006).

Existem evidências de que a ingestão de pequenas quantidades de biomassa microalgal pode afetar positivamente a fisiologia de animais aquáticos cultiváveis, auxiliando o sistema imunológico (BELAY, 1993).

A riqueza e a diversidade de espécies de microalgas presentes no ambiente aquático fazem com que seja grande a variedade de compostos químicos que podem ser extraídos desses organismos (PULZ; GROSS, 2004; LOURENÇO, 2006). Dentre estes produtos naturais, poucos são os estudos que identificam os polissacarídeos de microalgas, principalmente no que diz respeito à sua estrutura química fina, como tipo de ligações e grau de ramificações. Fatores que variam entre os diferentes grupos de microalgas e que podem influenciar as atividades biológicas de interesse destes compostos.

2.5 A microalga *Porphyridium cruentum* (RHODOPHYTA)

A microalga marinha *Porphyridium cruentum* (Figura 1) pertence à divisão Rhodophyta e é o único gênero de microalgas pertencente a esta divisão (LOURENÇO, 2006).

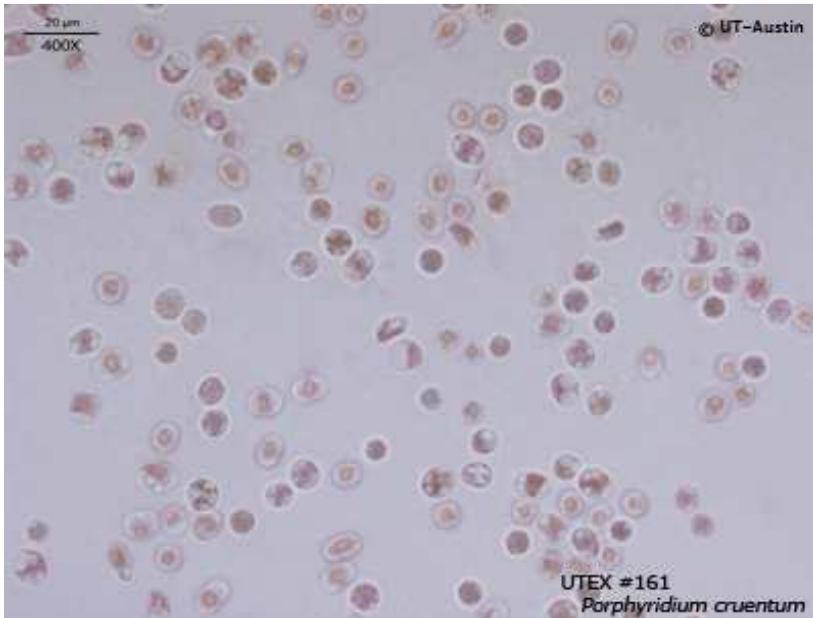


Figura 2 - *Porphyridium cruentum* (UTEX, 2013).

A parede celular de *Porphyridium* sp. É constituída por um polissacarídeo com uma parte solúvel que difunde no meio (exopolissacarídeo-EPS) produzido massivamente na fase estacionária de crescimento e que confere um aspecto gelatinoso a biomassa, e por uma parte que permanece ligada à parede celular (ARAD; ONTMAN, 2010; GERESH *et al.*, 2009).

Os exopolissacarídeos protegem as algas contra dessecação, temperatura, PH, salinidade e mudanças extremas de ambiente. Já bastante explorado quanto à estrutura, físico-química e atividades biológicas, o exopolissacarídeo de *Porphyridium* sp têm uma estrutura química proposta por GERESH *et al.* (2009), sabe-se que são polímeros aniônicos constituídos principalmente por L-Gal, D-Glc, D-Xyl, D-GlcA relação molar 1,0: 1,1: 2,1: 0,2, além de aproximadamente 10 % de grupos sulfato ligados à posição O-6 da D-Gal.

Os polissacarídeos isolados principalmente de microalgas vermelhas, como a *Porphyridium* sp., *Porphyridium aerugineum* têm mostrado atividade promissora contra uma ampla variedade de vírus.

Em geral os polissacarídeos que exibem atividade antiviral são altamente sulfatados e possivelmente o seu efeito inibitório seja

consequência da interação entre cargas negativas presentes nos polissacarídeos e as cargas positivas na superfície do vírus ou da célula do hospedeiro (HUHEIHEL *et al.*, 2001).

Já foram descritas atividades contra os vírus HIV, HSV e Varicela, principalmente *in vitro* e já foram realizados estudos *in vivo*, entretanto não foi elucidado ainda o mecanismo exato de ação destes polissacarídeos (HUHEIHEL *et al.*, 2001).

Estudos sobre o potencial efeito imunestimulante deste polissacarídeo, sobre o sistema imune de camarões, são importantes porque podem representar uma alternativa para aumentar a resistência e prevenir as enfermidades nestes animais.

2.6 A atividade imunomoduladora dos polissacarídeos

Polissacarídeos são macromoléculas naturais de ocorrência quase universal nos organismos vivos. Atuam em funções reconhecidas como esquelética na parede celular, de reserva alimentar, de proteção, entre outras, podendo ser definidos como polímeros formados por unidades simples monossacarídicas, ligadas por ligações glicosídicas (ASPINALL, 1970).

Os polissacarídeos encontrados nas algas podem ser armazenados como material de reserva, estes em geral são constituído principalmente por glucose (glucanas), ou ainda estrutural, os quais apresentam diversos padrões estruturais de ligações glicosídicas, ramificações e composição monossacarídica (SPOLAORE, 2006).

Dentre as glucanas encontradas em algas, existem variações quanto à estrutura e a conformação de sua cadeia. Nas macroalgas as mais comuns são as β -1,3 glucanas conhecidas como laminaranas. Para a maior parte das microalgas é mais comum identificar a presença de unidades de glucose α -1,4 ligadas, denominadas amilopectina ou amilose, dependendo da presença ou não de ramificações, porém alguns grupos apresentam unidades de glucose β -(1 \rightarrow 3) ligadas, conhecidas como crisolaminaranas, com diversas variações na estrutura da cadeia principal e das ramificações (GRANUM; MYKLESTAD, 2002; FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

Para ambas (macroalga e microalga), a composição do carboidrato, especialmente seu conteúdo de glucose, pode variar de acordo com fatores ambientais, e o período de crescimento (RIJSSEL *et al.*, 2000).

Com relação às macroalgas, a administração de extratos de varias espécies também tem sido reportados como forma de aumentar a resistência de diversas espécies de peixes e camarões sob infecções bacterianas. O efeito imunestimulatório de polissacarídeos de macroalgas foi amplamente estudado em peixes por Dalmo (1996) e Sakai (1999) e para camarões marinhos por SUNG, KOU E SONG (1994). Por serem explorados há mais tempo, os polissacarídeos de macroalgas possuem mais relatos na literatura em comparação aos relatos sobre este mesmo composto, encontrados para microalgas.

De acordo com Dalmo (1996), os peixes tratados com laminarana apresentaram aumento na produção de ânion superóxido em seus leucócitos, além de elevação na atividade da fosfatase nas células do rim. A laminarana também apresentou resultados positivos como aumento na sobrevivência em infecções bacterianas experimentais.

Farias (2000), encontrou atividade anticoagulante em peixes conferida pelos polissacarídeos sulfatados extraídos das macroalgas: *Cladophora vagabunda*, *Caulerpa sertularioides*, *Gelidiopsis gracilis*, *Champia feldmannii* e *Botryocladia occidentalis*.

Rebouças (2002) suplementaram a dieta de pós-larvas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com diferentes dosagens do polissacarídeo sulfatado da macroalga vermelha *Botryocladia occidentalis*, sendo observado um aumento significativo no peso final dos peixes em uma determinada dose.

Farias *et al.* (2004) demonstraram que a incorporação dos PS da macroalga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* na ração de tilápias, ministrada por 28 dias, durante a fase de reversão sexual, resultou em um aumento significativo no ganho de peso desses peixes.

Sung, Kou e Song (1994), em experimento realizado com *Penaeus monodon*, encontraram alta porcentagem de sobrevivência dos mesmos contra *Vibrio vulnificus* após os 18 dias de desafio, quando alimentados com um suplemento de 1,3 β -glucano em relação à dieta controle, sem suplementação com 1,3 β -glucano.

Uma solução de laminaranas extraídas da macroalga marrom *Laminaria digitata* aumentou a liberação de ânion superóxido de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* (CAMPA-CORDORA *et al.*, 2002).

Chang *et al.* (2003) utilizando a mesma espécie de camarão demonstrou que a suplementação de β -glucano na dieta na concentração de 10 g/kg, durante 20 dias, aumentou significativamente a sobrevivência após desafio com o vírus da síndrome da mancha branca.

Lopez *et al.* (2003), avaliando o efeito da suplementação de diferentes níveis de β -glucano e vitamina C para o camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, em resposta ao estresse, observaram aumento da resistência, ressaltando que tanto o β -glucano quanto a vitamina C agem por meio de diferentes vias de resposta ao estresse.

Em outro estudo, o polissacarídeo sulfatado fucoidana, extraído da macroalga marinha parda *Sargassum polycystum*, reduziu o impacto causado pela infecção com o vírus da mancha branca (WSV) no camarão *Penaeus monodon* (CHOTIGEAT *et al.*, 2004). Os autores reportaram que após a inclusão do fucoidana na dieta dos camarões foi observado um aumento significativo nas taxas de sobrevivência dos animais infectados. Além disso, o extrato bruto do fucoidana foi ainda capaz de inibir o crescimento de três bactérias Gram-negativas: *V. harveyi*, *Staphylococcus aureus* e *E. coli* (CHOTIGEAT *et al.*, 2004).

Os polissacarídeos sulfatados da macroalga *Botryocladia occidentalis* também foram utilizados em pós-larvas do camarão *L. vannamei*, submetidos aos agentes estressores, na forma de banhos de imersão (BARROSO, 2005) e incorporados na ração de camarões *L. vannamei* infectados com o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) (COSTA *et al.*, 2006), sendo observado, em ambos os casos, um aumento significativo da sobrevivência dos indivíduos.

YEH *et al.*, (2006) analisaram que a administração de extrato aquoso obtido a quente da espécie de macroalga *Sargassum duplicatum*, tanto por imersão quanto injeção, aumentou a habilidade imune do camarão *L. vannamei*.

Huang; Zhou e Zhang (2006) reportaram que o uso oral de polissacarídeo sulfatado extraídos da macroalga marinha parda *Sargassum fusiforme* no camarão *Fenneropenaeus chinensis*, infectado com *V. harveyi*, resultou em uma maior resistência destes animais à infecção por esta bactéria patogênica.

Os polissacarídeos sulfatados de microalgas também apresentam atividade imunestimulante. Como exemplo, pode ser citada a atividade imunestimulante dos polissacarídeos sulfatados extraídos de uma cianobactéria, *Cyanothece sp.* a qual foi demonstrada por Campa-Cordova *et al.* (2002). Os autores demonstraram que banhos de imersão com estes polissacarídeos promoveram um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase e na produção do ânion superóxido.

Segundo Lee *et al.* (2003), o camarão *Penaeus merguensis*, teve sua resistência aumentada, quando foi alimentado com ração contendo a microalga cianofíceia *Spirulina platensis*, devido à ativação da atividade

fagocitária dos hemócitos contra quatro bactérias estudadas: *Vibrio harveyi*, *Escherichia coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*. De acordo com os autores, esta atividade imunestimulante está relacionada à presença de lipopolissacarídeos e peptídeoglicanos na microalga *S. platensis*.

SKJERMO *et al.*, (2006) isolou um polissacarídeo de reserva da diatomácea marinha *Chaetoceros mulleri* e testou-o na alimentação de larvas do peixe *Gadus morhua* observando maiores taxas de sobrevivência, crescimento e peso nos organismos que receberam o tratamento.

JUSTIFICATIVA

Um dos principais problemas em aquicultura são as perdas associadas à ocorrência de enfermidades, as quais podem ser vistas como uma interação complexa entre hospedeiro, patógeno e ambiente. O ambiente de animais aquáticos é abundante em patógenos, sendo que a transmissão de doenças é extremamente fácil, especialmente em condições de altas densidades. Em muitas situações, o ambiente e o hospedeiro podem divergir fortemente das condições ideais. Em situação de desequilíbrio, os camarões são expostos a agentes estressores, reduzindo sua resposta imunológica, o que é determinante para o surgimento de enfermidades. Nestas circunstâncias, os camarões podem sofrer injúria por patógenos, levando os indivíduos à debilitação ou morte (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000).

A redução do estresse inclui ações de administração, higiene, nutrição, densidades adequadas e qualidade de água; já o controle da doença depende de três fatores: diagnose, tratamento e medidas preventivas (VAN DE BRAAK, 2002).

A ocorrência de doenças como o a mancha branca e o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), associados à acusação de *dumping* feita pelos Estados Unidos da América, rebaixaram o posto brasileiro de líder americano na produção de camarão, em 2003, para um pouco atrativo 3º lugar, precedido pelo México e Equador. Além disso, o Brasil perdeu a liderança mundial em termos de produtividade, com perdas na produção na ordem de 40 mil toneladas entre o período de 2003 a 2005 (SEIFFERT *et al.*, 2006).

Portanto, o uso de substâncias capazes de melhorar o desempenho zootécnico e a imunocompetência dos camarões, em paralelo a um bom manejo do cultivo, desponta certamente como uma ferramenta promissora na busca de uma maior proteção imunológica contra a ocorrência de enfermidades. Existe uma real necessidade de se

maximizar a imunocompetência de camarões em criação, minimizando o uso de agentes terapêuticos químicos, como antibióticos, que contaminam o pescado e o ambiente, além de induzir o aparecimento de microrganismos resistentes (BARRACO, PERAZZLO, ROSA, 2008).

Os polissacarídeos de várias origens são descritos como substâncias imunomoduladoras em vertebrados, sendo que a microalga *Porphyridium cruentum* produz um exopolissacarídeo sulfatado que é secretado em meio de cultura. A produção deste exopolissacarídeo pode ser facilmente induzida através da manipulação das condições de cultivo desta espécie.

Estudos sobre a utilização de polissacarídeos de microalgas em camarões são escassos e abordam a utilização principalmente via banho de imersão, prática em que o composto é dissolvido na água de criação, o que impossibilita determinar com precisão o quanto da substância está sendo utilizada pelos animais. Desta forma, o presente estudo foi desenvolvido para avaliar a influência da suplementação dietética do extrato de polissacarídeo da microalga *Porphyridium cruentum* no ganho em peso, na atividade das enzimas digestivas, nas respostas imunológicas e na sobrevivência de juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação dietética dos polissacarídeos sulfatados (PS), extraído da microalga *Porphyridium cruentum*, sobre juvenis de *Litopenaeus vannamei*.

Objetivos específicos

- Determinar se a suplementação dietética com o extrato bruto de polissacarídeos sulfatados da microalga *Porphyridium cruentum* afeta o ganho em peso e a sobrevivência do camarão.
- Estabelecer a concentração de polissacarídeos sulfatados mais adequada para a suplementação na ração.
- Determinar se as diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados provocam alterações no perfil de distribuição das enzimas digestivas do camarão.

- Determinar se a suplementação dietética com o extrato bruto de polissacarídeos sulfatados causa alterações nos parâmetros imunológicos contagem total de hemócitos (CTH) e atividade da fenoxidase (PO), antes e após desafio com a bactéria *Vibrio alginolyticus*.
- Determinar a sobrevivência, após desafio com *Vibrio alginolyticus*, em camarões que consumiram ração suplementada com os polissacarídeos sulfatados.

FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS

A tese está dividida em três capítulos. O primeiro referente à revisão bibliográfica e os demais correspondentes a dois artigos. O primeiro artigo está formatado segundo as normas da revista *Aquaculture Nutrition* e o segundo, da revista *Aquaculture*.

CAPÍTULO 2

DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DAS ENZIMAS DIGESTIVAS EM CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM EXTRATO DE POLISSACARÍDEOS DA MICROALGA *Porphyridium cruentum*

Renata Avila Ozório ^{a*}, Rafael Garcia Lopes ^a, Bruna Suede Góes ^a, Daniel Alexandre ^b, Carlos Peres da Silva ^b, Roberto Bianchini Derner ^a, Débora Machado Fracalossi ^a.

^a Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, (UFSC), Florianópolis, SC, 88034-001, Brasil.

^b Laboratório de Bioquímica de Insetos, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, (UFSC), Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil.

* Autor para correspondência: Laboratório de Cultivo de Algas, Servidão dos Coroas s/n (fundos), Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil. Tel.: +55 48 37212276.
e-mail: avilaozorio@yahoo.com.br (R. Ozorio).

* Artigo formatado de acordo com as normas da revista “Aquaculture Nutrition”

RESUMO

O extrato bruto de polissacarídeos, extraído da microalga *Porphyridium cruentum*, foi suplementado em diferentes concentrações (0%, 0,5%, 1%, 1,5% e 2,0%) a uma dieta comercial e fornecido a juvenis de *Litopenaeus vannamei* ($6,6 \pm 0,2$ g). Os camarões (n=2000) foram alimentados ad libitum, durante 30 dias, em tanques circulares com 12 m² de área de fundo (100 camarões por tanque), água oceânica (salinidade 33), variáveis ambientais (temperatura, oxigênio dissolvido, fotoperíodo e níveis de amônia total) controladas. A suplementação de 1% foi o responsável pelo maior ganho em peso 7,28g em 30 dias. A composição corporal não foi afetada pela suplementação, assim como a sobrevivência. Entretanto, verificou-se um deslocamento da atividade das enzimas digestivas do hepatopâncreas para as porções anterior e média do intestino nas suplementações com até 1% de polissacarídeo, o que pode contribuir para uma melhor eficiência digestiva. Acima de 1,5% de suplementação a atividade das enzimas digestivas foi deslocada para a porção final do intestino local onde não há absorção de nutrientes, levando a crer que nutrientes e enzimas digestivas foram perdidos através das fezes. Considerando-se as doses testadas, sugere-se uma faixa de suplementação do extrato de polissacarídeos entre 1% e 1,5%, para aumentar o ganho em peso e otimizar a atividade das enzimas digestivas nos intestinos dos camarões juvenis de *L. vannamei*.

Palavras-chaves: *Litopenaeus vannamei*, polissacarídeos, *Porphyridium cruentum*, ganho em peso, enzimas digestivas.

ABSTRACT

The crude polysaccharide extracted from microalgae *Porphyridium cruentum*, was supplemented with different concentrations (0%, 0.5%, 1%, 1.5% and 2.0%) to a commercial diet and provided to juvenile *Litopenaeus vannamei* (6.6 ± 0.2 g). Shrimps ($n = 2000$) were fed ad libitum for 30 days in circular tanks with 12 m² of bottom area (100 shrimp per tank), oceanic water (salinity 33), environmental variables (temperature, dissolved oxygen, photoperiod and levels of total ammonia) controlled. Supplementation of 1% was responsible for the biggest gain in weight 7.28 g in 30 days. Body composition was not affected by supplementation, as well as survival. However, there was a shift in the activity of digestive enzymes from the hepatopancreatic to anterior and medial portions of the intestine to the supplementation with 1% polysaccharides, which might contribute to a better digestive efficiency. Above 1.5% supplemental digestive enzyme activity was shifted to the final portion of the intestine where there is absorption of nutrients, leading to believe that nutrients and digestive enzymes were lost through faeces. Considering the doses tested, we suggest a range of polysaccharides extract supplementation between 1% and 1.5%, to increase weight gain and optimize the activity of digestive enzymes in the intestines of juvenile shrimp *L. vannamei*.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, polysaccharides, *Porphyridium cruentum*, weight gain, digestive enzymes.

INTRODUÇÃO

Pesquisas com o uso de dietas preparadas artificialmente com alimentos funcionais, os quais têm a capacidade de atuar na saúde dos organismos cultivado e resistência ao estresse e agentes causadores de doenças assumem grande importância (GATLIN 2002).

Os aditivos ou suplementos alimentares utilizados na aquicultura com o objetivo de melhorar o desempenho zootécnico e a sanidade dos animais podem ser imunonutrientes, imunoestimulantes, probióticos e prebióticos (GATLIN, 2006).

Segundo Bricknell e Dalmo (2005), os imunoestimulantes são importantes ferramentas com potencial para utilização na aquicultura como forma de minimizar perdas devido às doenças.

A administração destes compostos imunoestimulantes como suplemento dietético apresenta vantagens já que pode ser ministrado simultaneamente para uma grande quantidade de indivíduos, prevenindo o estresse resultante do manejo dos animais (Smith, 2003).

Segundo SKJERMO *et al.* (2006), estimular o sistema de defesa não específico melhora o crescimento e a resistência a doenças além de ser potencial medida para aumentar o controle microbiano em produções juvenis de peixes marinhos, crustáceos e moluscos.

Nos últimos anos cresceu o interesse científico na investigação e identificação de compostos biologicamente ativos oriundos de algas, dentre estes compostos, os polissacarídeos. Essas substâncias têm sido cada vez mais utilizadas na aquicultura como imunoestimulantes, devido à grande variedade de parasitas, fungos, bactérias e vírus que afetam a produção dos organismos aquáticos, causando grandes perdas econômicas (BOISSON-VIDAL, *et al.*, 1995; TINMAN *et al.*, 2000).

Apesar das vantagens citadas acima, a inclusão de um ingrediente novo, mesmo em pequenas quantidades, pode provocar a inibição da atividade de algumas enzimas e a diminuição do ganho em peso (Lemos *et al.*, 2004). Portanto, o estudo do comportamento das enzimas digestivas é um ponto relevante para a compreensão do mecanismo de digestão de qualquer nutriente incluído ou suplementado na dieta (Le Moullac *et al.*, 1997; Almeida Neto, 2011), sendo uma alternativa para indicar o estado nutricional dos animais (Melo 2004).

Em geral os peneídeos adaptam-se muito bem a mudanças na composição da dieta por indução de enzimas digestivas sintetizadas e secretadas no hepatopâncreas (Le Moullac *et al.*, 1997). Esta adaptação da atividade enzimática ao conteúdo nutricional da dieta também foi descrito por Delgado *et al.* (2003) e Devakaran *et al.* (2004) em

experimentos com grupos de camarões *Litopenaeus vannamei* submetidos a dietas com diferentes composições.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação dietética com diferentes concentrações de extrato bruto de polissacarídeos sulfatados da microalga *Porphyridium cruentum* sobre a sobrevivência, ganho em peso, e a atividade das enzimas digestivas de juvenis do camarão *L.vannamei*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do extrato bruto de polissacarídeos

O extrato bruto de polissacarídeos foi extraído com uma solução de papaína bruta (30 mg mL⁻¹) em 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM (AcNa) a partir de 5 g. Em seguida, o material foi filtrado e após centrifugação (7.965 × g; 20 min.; 10 °C), os PS presentes na mistura foram concentrados por precipitação com 16 mL de cloreto cetilpiridínio (CCP) a 10%, lavado (200 mL; CCP 0,05%) e posteriormente dissolvido em 174 mL de NaCl 2 M: etanol absoluto (100: 15; v/v). Logo após uma precipitação com etanol absoluto (24 h; 4 °C), o material foi lavado com etanol 80% (200 mL; 2 ×), etanol absoluto (200 mL; 1 ×) e seco em estufa durante 24 horas a 60 °C (FARIAS *et al.*, 2000).

Preparação das dietas

Diferentes concentrações de extrato de polissacarídeos da microalga *Porphyridium cruentum* (0,5%, 1,0 %; 1,5% e 2,0%) foram adicionadas a uma ração comercial para camarão marinho (Guabi[®], 40% de proteína bruta e 7,5% de extrato etéreo). A ração foi triturada separada em lotes de 5kg e cada lote recebeu a uma suplementação referente às concentrações acima especificadas. Os lotes suplementados foram misturados 1 a 1 por 15 minutos em misturador modelo Y. Em seguida a mistura seca foi colocada em uma batedeira onde foi adicionada água morna em quantidade suficiente para que uma massa consistente fosse formada. Na sequência a massa foi extrusada em um moedor elétrico de carne e os péletes formados foram secos em estufa com circulação de ar a 60°C por 24 h, embalados em sacos plásticos e armazenados a 4°C. O lote de ração sem adição de extrato bruto de

polissacarídeo (0%), que serviu como controle, foi submetido aos mesmos procedimentos das demais.

Material biológico e condições experimentais

Um total de 2.000 juvenis de camarão branco *Litopenaeus vannamei* com peso inicial de $6,6 \pm 0,2$ g, camarões SPF (*specific pathogen free ou livre de patógenos*), foram distribuídos aleatoriamente em 20 tanques de fibra de vidro (12 m^2 fundo, quatro tanques por tratamento, 100 camarões por tanque). As cinco dietas experimentais foram designadas aleatoriamente a quatro tanques. Durante 30 dias, os camarões foram alimentados duas vezes ao dia, às 10:00 h e às 17:00 h. Em todos os tratamentos os camarões foram alimentados à vontade. A renovação diária da água dos tanques foi realizada às 8 h e às 14 h, correspondendo a 50% do volume total de cada tanque.

As variáveis ambientais foram monitoradas durante o experimento, o oxigênio dissolvido, a temperatura e a salinidade foram medidas duas vezes ao dia (oxímetro YSI 55 e refratômetro YSI 30, respectivamente). A amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) foi analisada a cada 10 dias imediatamente após a coleta em espectrofotômetro LAMOT (smart espectro 2000). As amostras foram previamente filtradas com microfiltros de acetato celulose com porosidade $0,45\mu\text{m}$ (Sartorius). As análises foram realizadas de acordo com Strickland e Parsons (1972).

Biometrias foram realizadas a cada dez dias para acompanhar o ganho em peso dos animais. Os animais coletados para biometria não eram devolvidos ao tanque, mas sim dissecados para remoção dos intestinos e determinação das atividades enzimáticas. Ao final de 30 dias, as seguintes variáveis foram calculadas:

$$\text{Ganho em peso (GP)} = 100 * \left(\frac{\text{peso final} - \text{peso inicial}}{\text{peso corporal inicial}} \right)$$

$$\text{Sobrevivência} = 100 * \left(\frac{\text{número final de camarões}}{\text{número inicial de camarões}} \right)$$

Coleta de tecidos para ensaios enzimáticos

Para remoção dos intestinos e hepatopâncreas, os camarões ainda vivos eram colocados no gelo e em seguida eram dissecados em solução salina gelada (250 mM NaCl). As amostras de intestino foram divididas em três seções (anterior, média e posterior). O hepatopâncreas e as seções do intestino foram homogeneizados com 1 e 2 mL de água fria duplamente destilada, respectivamente, utilizando-se um homogeneizador Potter-Elvehjem. Os tecidos homogeneizados foram centrifugados a 10.000 g durante 30 min a 4°C, sendo que os sobrenadantes e os sedimentos foram utilizados para os ensaios enzimáticos.

Condições dos ensaios enzimáticos e determinação de proteínas

As atividades sobre celobiose (20 mM), maltose (10 mM) e sacarose (20 mM) foram determinadas através da medição da liberação de glicose de acordo com o método de Dahlqvist (1968). As atividades sobre rafinose (20 mM) e amido gelatinizado (0,5%, w v⁻¹) foram medidas por meio da determinação do poder redutor no meio, de acordo com o método de Noelting e Bernfeld (1948). Todos os ensaios para carboidrases foram realizados em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5,2, exceto para α -amilase, em que foi utilizado tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, contendo NaCl 20 mM e de CaCl₂ 2 mM.

A atividade das proteinases total foi determinada usando como substrato a proteína azoalbumina. Os ensaios usando azoalbumina foram adaptados a partir de um método previamente descrito por Lemos *et al.* (1990). Extratos (100 μ L por ensaio) foram incubados com 100 μ L de uma mistura de substrato de 1% (w v⁻¹) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,5. A proteólise foi terminada pela adição de 50 μ L de ácido tricloroacético 30% (w v⁻¹) e a reação foi incubada durante 15 min em gelo. O substrato precipitado foi removido por centrifugação durante 5 min a 7000 x g à temperatura ambiente. A alíquota de 100 μ L do sobrenadante foram adicionados 100 μ L de solução de NaOH 2N e a absorbância foi lida a 440 nm.

A hidrólise de derivados de p-nitroanilida N-succinil-Alanil-Alanil-Prolil-Phenilalanil-p-nitroanilida (SAAPF-pNA) e N-a-benzoil-L-Arginil-p-nitroanilida (BAPNA) foram ensaiados pela liberação de p-nitroanilina, que absorve no máximo a 410 nm (Erlanger *et al.*, 1961).

Os ensaios utilizaram 50 μL de quatro substratos 2 mM, 50 μL de fontes de enzima, e 100 μL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,5, com ou sem inibidores. A reação foi terminada por adição de 100 μL de ácido acético 30% ($v v^{-1}$), sendo a absorbância lida a 410 nm.

Todos os ensaios foram realizados a 30°C. Os tampões (50 mM) utilizados na determinação do pH ótimo foram: acetato de sódio, citrato de sódio-fosfato, tampão Tris-HCl, com valores de pH que variam de 3 a 9, com intervalos de 0,2 unidades de pH. As incubações foram efetuadas durante pelo menos quatro períodos de tempo diferentes e as velocidades iniciais de hidrólise foram calculadas. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de uma enzima que catalisa a clivagem de 1 μmol de substrato min^{-1} . Pequenas quantidades de enzimas foram expressas em miliunidades (mU).

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Smith *et al.* (1985), modificado por Morton e Evans (1992), utilizando soro albumina bovina como padrão.

Análise estatística

O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado, com cinco níveis de suplementação de extrato de polissacarídeo (0%, 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%) e quatro repetições para cada tratamento. Os dados de ganho em peso, composição corporal e a sobrevivência foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, foi aplicado o teste de DUNCAN para separação das médias, a um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ganho em peso, sobrevivência e composição proximal do músculo.

Durante o período experimental, a temperatura da água, salinidade, oxigênio dissolvido, níveis de amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) e fotoperíodo foram, respectivamente, $25,9 \pm 0,15^\circ\text{C}$; $33 \pm 0,1$; $6,0 \text{ mg L}^{-1}$; $0,06$ a $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ e 12 h.

A concentração de polissacarídeo que conferiu o melhor ganho em peso, aproximadamente 7,28 g em 30 dias, foi 1% (Tabela 1). A

sobrevivência foi elevada (90 a 97%), não diferindo significativamente entre os tratamentos (Tabela 1). A suplementação da dieta com o extrato bruto de polissacarídeo não causou nenhuma alteração importante na composição centesimal do músculo dos camarões, não havendo diferenças significativas entre as concentrações suplementadas para os conteúdos de proteína corporal, cinzas e umidade (Tabela 2).

Tabela 1. Ganho em peso e sobrevivência de juvenis de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dieta suplementada com diferentes concentrações de extrato bruto de polissacarídeo sulfatado da microalga *Porphyridium cruentum* por 30 dias.

Dieta	Peso final (g)	Ganho em Peso (g)	Sobrevivência (%)
1 (0% de PS)	12.43 ±0.3 ^b	5,73 ±0,16 ^b	90.7 ±7.4 ^a
2 (0.5% de PS)	13.50 ±0.8 ^a	6,90 ±0,39 ^a	97.4 ±1.4 ^a
3 (1.0% de PS)	13.80 ±0.5 ^a	7,28 ±0,62 ^a	94.1 ±7.9 ^a
4 (1.5% de PS)	13.55 ±0.6 ^a	6,73 ±0,29 ^a	95.0 ±8.2 ^a
5 (2.0% de PS)	13.18 ±0.4 ^{ab}	6,68 ±0,62 ^{ab}	94.5 ±7.1 ^a

¹Médias em cada linha diferem pela análise de variância (P>0,05)

Tabela 2. Composição centesimal do músculo do camarão branco após 30 dias de alimentação com dietas suplementadas com diferentes concentrações de extrato bruto de polissacarídeo sulfatado da microalga *Porphyridium cruentum* (g kg⁻¹ peso úmido)¹.

Frações	% de Suplementação				
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Proteína bruta	21,24	22,01	21,88	21,50	21,78
Umidade	76,67	75,35	75,29	75,95	75,29
Extrato etéreo	0,30	0,40	0,10	0,10	0,10
Cinzas	1,34	1,46	1,42	1,36	1,00

¹Médias em cada linha não diferem pela análise de variância (P>0,05).

A suplementação de extrato bruto de polissacarídeo sulfatado não afetou a sobrevivência, mas influenciou significativamente no ganho em peso de juvenis de camarão branco quando comparado ao controle, sem suplementação. A suplementação aumenta o ganho em peso na faixa de suplementação de 0,5% a 1,5%, mas a partir deste ponto, diminui. Com esta concentração, o ganho em peso é otimizado e estimado em 7,28 g ao final do experimento.

Na literatura, o uso de polissacarídeos com a finalidade de otimizar ganho em peso, parâmetros imunológicos e sobrevivência de camarões marinhos aparece como uma das alternativas promissoras e viável ao nível experimental.

Os trabalhos que descrevem o uso dos polissacarídeos, via banhos de imersão, relatam que esta via de administração aumenta a sobrevivência e a resistência dos camarões frente a desafios das mais diversas naturezas (estresse ambiental, infecções bacterianas, infecções virais), mas não apresentam resultados positivos para o ganho em peso principalmente porque o manejo gera estresse nos animais e o contato com o imunostimulante é praticamente externo e por um curto período de tempo.

Apesar do principal propósito para o uso de um imunostimulante ser o aumento na resistência dos indivíduos, o incremento no ganho em peso é considerado um efeito bastante relevante na carcinocultura. Em 2005, Brincknell e Dalmo, já haviam verificado que a suplementação de imunostimulantes na dieta otimizava a absorção destes compostos e isto se refletia no aumento do ganho em peso.

O uso de polissacarídeos sulfatados na dieta de camarões marinhos é relatado desde 1994, quando Sung, Kou e Song utilizaram β -glucanas como suplementação dietética para *Penaeus monodon*, visando o aumento da resistência destes animais a vibrioses. Neste estudo, os animais, além de apresentarem maior resistência, também apresentaram significativamente maior ganho, quando alimentados com dietas suplementadas com polissacarídeos.

Cruz-Suárez e colaboradores (2000) verificaram que a suplementação da dieta com o polissacarídeo sulfatado extraído da macroalga *Macrocytis pyrifera* melhorou o crescimento de juvenis de *L. vannamei*.

O mesmo efeito positivo no crescimento foi observado também em juvenis de *L. vannamei* alimentados com dietas suplementadas com Ergosan[®] (Merck Animal Health, EUA), um produto comercial preparado a partir de polissacarídeo (ácido algínico) extraído da macroalga *Laminaria digitata* (Montero-Rocha *et al.* 2006).

Em 2012, Zhao e colaboradores relataram o efeito benéfico no crescimento de camarões *L.vannamei* alimentados com dietas suplementadas com β -glucanas. Efeitos similares na melhora do crescimento e eficiência alimentar foram registrados para juvenis de *Marsupenaeus japonicus*, quando alimentados com dieta suplementada com fucoidana, polissacarídeo extraído da macroalga *Undaria pinnatifida* (Traifalgar *et al*, 2010).

Distribuição espacial das enzimas digestivas no intestino e hepatopâncreas do camarão branco

Determinações enzimáticas sugerem que as enzimas digestivas são produzidas e secretadas no hepatopâncreas e que estão distribuídos em um gradiente de concentração ao longo do intestino (Fig. 2). As atividades proteolíticas testadas são encontradas em maiores quantidades no hepatopâncreas e eles estão diminuindo ao longo do intestino médio para o intestino posterior (Fig. 2 A, Fig. 2 C e 2 D). Ao comparar a atividade com as concentrações crescentes de polissacarídeo na dieta, não houve nenhuma alteração na atividade do hepatopâncreas, mas sim um aumento da atividade proteolítica na sequência do intestino anterior aos restantes segmentos distais, o que sugere a existência de um carreamento de enzimas digestivas produzida no hepatopâncreas para o intestino.

Semelhante às proteinases, a distribuição das atividades enzimáticas sobre o amido mostrou padrões diferentes no hepatopâncreas e ao longo do intestino (Fig. 2 B). Vale a pena notar que a distribuição maior da α -amilase mostra um maior deslocamento da atividade ao longo do intestino, principalmente para as porções média e posterior do intestino, quando a concentração do polissacarídeo na dieta se tornar maior que 1,0%.

A atividade em relação à maltose (Fig. 3) tem o mesmo comportamento do amido, formando um gradiente da enzima ao longo do intestino médio em resposta às doses crescentes do polissacarídeo. As outras atividades sobre os substratos melibiose (Fig. 3 B), sacarose (Fig. 3 C) e celobiose (Fig. 3 D), apresentam um padrão difuso onde não é possível relacionar qualquer diferença na sua atividade em relação às doses crescentes de polissacarídeo na dieta.

É importante notar que a atividade sobre estes substratos na hepatopâncreas não eram maiores em comparação com as atividades medidas no intestino médio.

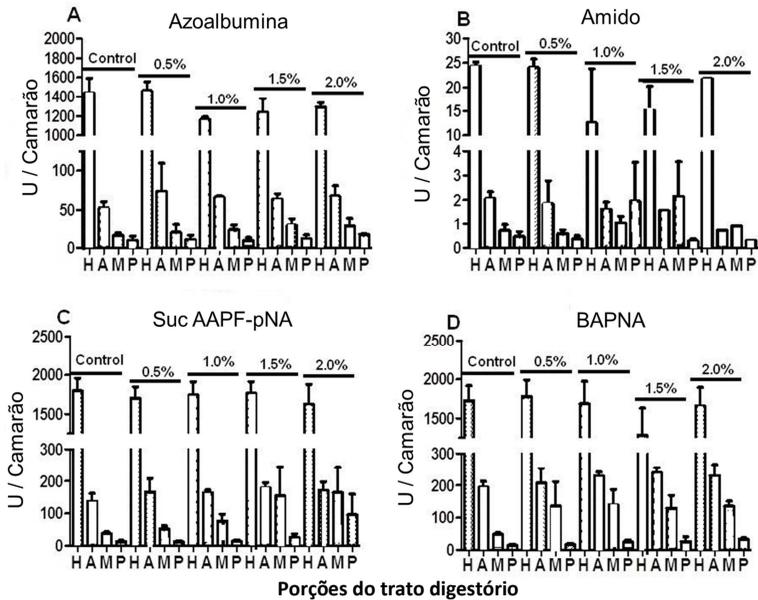


Figura 3. Deslocamento da atividade das enzimas digestivas, proteinases (A, C, D) e α -amilase (B) no hepatopâncreas (H), intestino anterior (A), médio (M) e posterior (P) no camarão branco, quando alimentado com dietas suplementadas com níveis crescentes do extrato bruto de polissacarídeo sulfatado da microalga *Porphyridium cruentum*.

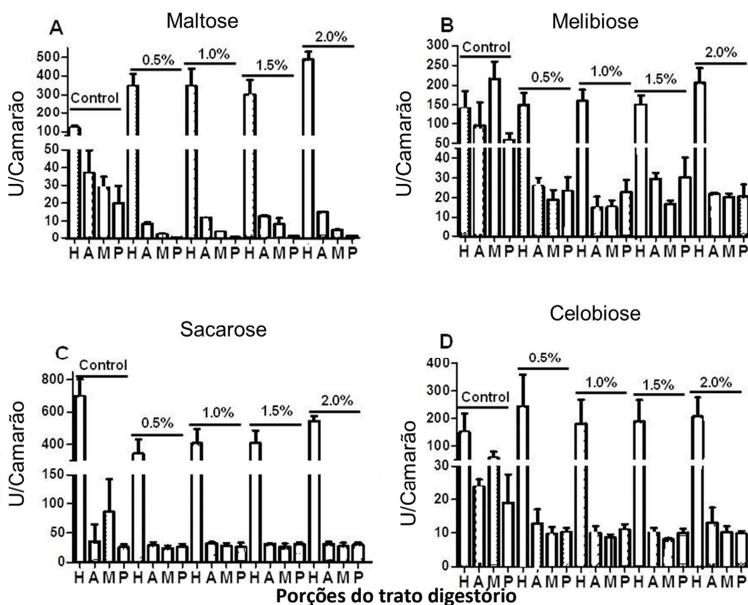


Figura 4. Deslocamento da atividade das enzimas digestivas, carboidrases (A, B, C e D) no hepatopâncreas (H), intestino anterior (A), médio (M) e posterior (P) no camarão branco, quando alimentado com dietas suplementadas com níveis crescentes do extrato bruto de polissacarídeo sulfatado da microalga *Porphyridium cruentum*.

O deslocamento da atividade enzimática frente às doses crescentes de extrato de polissacarídeo nos substratos testados tem uma implicância direta na eficiência de digestão dos nutrientes da dieta. A formação de um gradiente aonde o complexo enzima-substrato vai se desfazendo em unidades menores para serem absorvidos é o comportamento ideal.

Neste trabalho foi verificado que a suplementação com extrato de polissacarídeo, que o gradiente de enzimas pode ser mantida na maioria dos substratos testados até a suplementação de 1%, considerando as doses testadas. A partir desda concentração o gradiente passou a ser desfeito e o aparecimento de enzimas na parte posterior do intestino aumentou. O que não é desejável uma vez que na região posterior do

intestino não há absorção de nutrientes e possivelmente estas enzimas sejam perdidas nas fezes. A importância da formação de um gradiente de enzimas ao longo do intestino pode ser mais bem compreendido quando levamos em consideração a existência da membrana peritrófica.

A membrana peritrófica é uma camada acelular, semipermeável composta por quitina e proteínas que envolvem o bolo alimentar e ocorre exclusivamente no intestino médio (responsável pela maior parte da digestão e absorção dos nutrientes). A membrana peritrófica delimita o espaço endoperitrófico (onde se encontra o bolo alimentar) do espaço ectoperitrófico (espaço entre a membrana peritrófica e o epitélio intestinal) Terra e Ferreira (1981).

A importância desta compartimentação está no modelo de digestão proposto por Ferreira *et al.*, (1990). Neste modelo o complexo enzima-substrato é levado com o bolo alimentar até que o substrato diminua de tamanho e tanto as enzimas quanto os oligômeros conseguem passar pelos poros da membrana peritrófica e atingir o espaço ectoperitrófico. Ali um contra-fluxo de fluidos empurra-os para a região anterior onde são absorvidos e podem entrar novamente no espaço endoperitrófico, reciclando as enzimas.

De acordo com Terra (2001) este modelo de circulação endo-ectoperitrófico aumenta a eficiência de digestão porque permite a reutilização de enzimas e a otimização da aquisição de nutrientes. Os dados obtidos para ganho em peso corroboram com o que foi encontrado para o comportamento das enzimas.

Nas concentrações de suplementação com o extrato de polissacarídeo onde o gradiente de enzimas se manteve, o ganho em peso dos animais foi maior. O que sinaliza que também para os camarões a ocorrência da circulação ecto-endoperitrófica auxilia na otimização da digestão dos nutrientes da dieta.

CONCLUSÕES

A suplementação da dieta com extrato de polissacarídeo da microalga *Porphyridium cruentum* mostra-se como uma alternativa viável para aumentar o ganho em peso do camarão branco. Considerando-se as doses testadas uma faixa de suplementação entre 1% a 1,5% deve ser considerada para maximizar o ganho em peso e para que o gradiente de atividade enzimática seja mantido longo do intestino. A relação entre a existência da circulação endo-ectoperitrófica e a otimização da digestão em camarões marinhos é um assunto recente e

pouco estudado, que demanda pesquisas adicionais para melhor entendimento.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Bruna Mattioni do Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI-UFSC) e aos funcionários do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM-UFSC) pelo apoio logístico na realização das análises de composição proximal e no andamento do experimento, respectivamente.

REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO 2

Almeida Neto, M. E. Relação entre padrão comportamental, estágios do ciclo de muda, e atividades de enzimas digestivas proteolíticas em juvenis de camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (CRUSTACEA:PENAEIDAE). 2011. 110f. Tese (Pós-graduação em Psicobiologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN 2011.

Boisson-Vidal, C. *et al.* A. Biological activities of polysaccharides from marine algae. *Drugs of the future*. v. 20, n. 12, p. 1237-1249, 1995.

Bricknell, I.; Dalmo, R. A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, v. 19, p.457 - 472, 2005

Cruz-Suárez, E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C., 2000. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. p. 227-266. Editores Lucia Elizabeth Cruz-Suárez, Denis Ricque-Marie, Mireya Tapia-Salazar, Miguel A. Olvera-Novoa, y Roberto Cerecedo-Olvera. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del Quinto Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México.

Delgado, J. G.; Molina, C.; Cahu, C. Digestive enzyme activity and food ongesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research*, v. 34, p. 1403-1411, 2003.

Devakaran, S.; Forster, I. P.; Velascos, M. Limitations on the use of shrimp *Litopenaeus vannamei* midgut gland extract for the measurement of in vitro protein digestibility. *Aquaculture*, v. 239, p. 323-329, 2004.

Erlanger, B. F.; Cohen, W.; Kokowsky, N. Preparation and properties of 2 new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 1961.

Farias, W.R.L., 2000. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. *J Biol Chem*, 38, 29299-29307, 2000.

Ferreira, C.; Oliveira, M. C.; Terra, W. R.. Comartmentalization of the digestive process in *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae), insect *Biochem.* 20, p.267-274, 1990.

Gatlin III, D. M. Nutrition and fish health. In: Halver, J. E.; Hardy, R. W. (Ed). *Fish nutrition*. New York: Academic Press, chap 12, p. 671-702, 2002.

Gatlin III, D. M.; Li, p.; Wang, X.; Burr, G. S.; Castille, F.; Lawrence, A. L.. Potencial application of probiotics in aquaculture. In: *Simposium internacional de Nutrición Acuícola, Monterrey. Avances em nutrição acuícola: memórias...* Monterrey, p. 371-376, 2006.

Le Mpoullac, G.; Le Groumellec, M.; Ansquer, D.; Frosissard, S.; Levy, P.; AQUACOP. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibrioses. *Fish and Shellfish immunology*, v. 7, p. 227-234, 1997.

Lemos, D.; Navarrete del Toro, A.; Córdova-Mureta, J. H.; Garcia-Carreño, F. Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: in vitro determination of protein digestibility and proteinase inhibition. *Aquaculture*, v. 239, p. 307-321, 2004.

Lemos, F. J. A., Campos, F. A. P., Silva, C. P. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna-unguiculata*) seeds. *Entomol Exp Appl*, 56, 219-227, 1990.

Melo, J. F. B. Digestão e Metabolismo de Jundiá *Rhamdia quelen* submetido a diferentes regimes alimentares. 2004. 80f. Tese (Pós-graduação em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

Montero-Rocha, A. Immunostimulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following dietary administration of Ergosan. Journal of Invertebrate Pathology, v. 91, n. 03, p. 188-194, 2006.

Morton, R.E., Evans, T. A. Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein-content. Anall Biochem, 204, 332-334, 1992.

Noelting, G., Bernfeld, P., 1948. Sur les enzymes amylolytiques .3. La beta-amylase - dosage dactivite et controle de labsence dalpha-amylase. Helv Chim Acta, 31, 286-290.

Skjermo, J.; Størseth, T.R.; Hansen, K.; Handå, A.; Øie, G. Evaluation of β -(1-3, 1-6)-glucans and High-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*L.). Aquaculture, v. 261, p. 1088–1101, 2006.

Smith, V.; Brown, J. H.; Hauton, C., Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. Fish and Shellfish Immunology, v. 0, p.1-20, 2003.

Strickland, J. D. H.; Parsons, T. R. A practical handbook of seawater analysis Bulletin Fisheries Research board of Canada, Ottawa, n. 167, p. 1- 205, 1972.

Sung, H.H.; Kou, G.H.; Song, Y.L.. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish pathology, v. 29, p.11-17, 1994

Terra, W. R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. Arch, Insect Biochem. Physiol. 47, 47-61, 2001.

Terra, W. R., Terra, I. C. M., Ferreira, C., de Biachi, A. G. Carbodiimide-reactive carboxyl groups at the active site of an insect midgut trehalase. *Biochim. Biophys. Acta*, 571, 79 – 85, 1981

CAPÍTULO 3

POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA MICROALGA *Porphyridium Cruentum* COMO ALTERNATIVA PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA DE JUVENIS DE *Litopenaeus vannamei* À INFECÇÃO POR *Vibrio alginolyticus*

Renata Avila Ozório ^{a*}, Rafael Garcia Lopes ^a, Felipe do Nascimento Vieira ^a, Norah Constanza Bolivar ^a, Roberto Bianchini Derner ^a, Margherita Anna Antônia Maria Barracco ^b, Débora Machado Fracalossi^a.

^a Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, (UFSC), Florianópolis, SC, 88034-001, Brasil

^b Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brasil

* Autor para correspondência: Laboratório de Cultivo de Algas, Servidão dos Coroas s/n (fundos), Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, SC, Brasil. Tel.: +55 48 37212276.
e-mail: avilaozorio@yahoo.com.br (R. Ozorio).

* Artigo formatado de acordo com as normas da revista “Aquaculture”

RESUMO

Avaliou-se o efeito da administração oral, durante 30 dias, de diferentes doses (0%, 0,5%, 1%, 1,5% e 2%) de extrato bruto de polissacarídeos sulfatados, proveniente da microalga *Porphyridium cruentum*, sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* desafiados com *Vibrio alginolyticus*, através da avaliação de parâmetros hemato-imunológicos e sobrevivência. Antes do desafio, a atividade da fenoloxidase (PO) apresentou um aumento proporcional ao aumento na inclusão do polissacarídeo e a contagem total de hemócitos (CTH) apresentou um aumento maior, porém não significativo, no tratamento que recebeu 1% de suplementação. Após o desafio, os animais alimentados com a dieta contendo 1% de extrato de polissacarídeos sulfatados apresentaram a maior sobrevivência (90%) em 48 h, enquanto que os animais do grupo controle, sem suplementação, assim como os alimentados com dieta contendo 2% de extrato de polissacarídeo tiveram uma sobrevivência de aproximadamente 63% em 48 h. Também após 48 h do desafio, a CTH, que diminuiu em todos os tratamentos, continuou sendo mais elevada nos animais que receberam a suplementação com polissacarídeo. Já a atividade da PO mostrou um aumento proporcional às doses crescentes do polissacarídeo na dieta. Os resultados sugerem que os animais alimentados com a dieta suplementada com o extrato bruto de polissacarídeos sulfatado foram imunoestimulados e tornaram-se mais resistentes.

Palavras chaves: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio alginolyticus*, imunoestimulante, *Porphyridium cruentum*.

ABSTRACT

We evaluated the effect of oral administration for 30 days at different doses (0%, 0.5%, 1%, 1.5% and 2%) of crude extract of sulfated polysaccharides derived from the microalga *Porphyridium cruentum* on conditions for shrimps *Litopenaeus vannamei* immunocompetence challenged with *Vibrio alginolyticus* through evaluation of immunological parameters, hematology and survival. Before the challenge, the activity of phenoloxidase (PO) increased proportional to the increase in the inclusion of the polysaccharide and total count of hemocytes (THC) showed a greater increase, although not significant, the treatment he received 1% supplementation. After challenge, the animals fed the diet containing 1% extract of sulfated polysaccharides showed the highest survival (90%) in 48 h, while the control animals without supplementation, as well as a diet containing 2% polysaccharide extract had a survival of approximately 63% at 48 h. Also after 48 h of challenge, THC, which decreased in all treatments remained higher in animals that received supplementation with polysaccharides. The activity of PO showed a proportional increase with the increasing doses of polysaccharide in the diet. The results suggest that animals fed the diet supplemented with the crude extract of sulfated polysaccharides were imunoestimulados and become more resilient.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio alginolyticus*, immunostimulant, *Porphyridium cruentum*.

INTRODUÇÃO

Uma das maiores restrições em fazendas de camarão são as doenças causadas por patógenos infecciosos virais e bacterianos responsáveis por várias perdas econômicas na indústria aquícola mundial (Sarathi *et al.*, 2007). As vibrioses têm sido a causa das maiores mortalidades em camarões peneídeos juvenis (Gomez-Gil *et al.*, 2000; Bachère, 2000). Doenças causadas por *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi* deixam sérios problemas no cultivo do camarão *Penaeus monodon* na Índia (Sarathi *et al.*, 2007).

A sustentabilidade da indústria do camarão depende em grande parte do controle de doenças e do estado de saúde do camarão. Diversos autores têm trabalhado na quantificação de diferentes parâmetros celular e humoral na resposta imune de espécies de camarões cultivados (Rengpipat *et al.*, 2000; Hsu; Chen, 2007). Uma das ferramentas disponíveis para avaliações imunológicas é a contagem de hemócitos (Le Moullac; Haffner, 2000).

A contagem total de hemócitos (CTH) e a atividade fenoloxidase (PO) têm sido consideradas como marcadores de saúde, uma vez que mudanças nestes parâmetros podem estar relacionadas a infecções por patógenos e condições adversas (Sritunyalucksana; Söderhäll, 2000). Os hemócitos dos crustáceos representam o papel principal na resposta imune, realizando funções como fagocitose, encapsulação, formação de nódulo e mediação de citotoxicidade (Johansson *et al.*, 2000).

Os crustáceos têm um sistema imune inato, caracterizado pela ausência de imunoglobina e memória imunológica, atualmente uma estratégia bastante difundida para melhorar a resistência dos camarões, uma vez que estes não podem ser vacinados é a utilização de compostos imunostimulantes (Smith *et al.*, 2003). Em crustáceos, a imunostimulação é profilática, estimulando o sistema imunológico não específico, ativando ou melhorando a vigilância e a reação contra ameaças de patógenos (Smith *et al.*, 2003).

Para este fim, muitas substâncias já foram testadas, tais como os β -glucanos, produtos bacterianos, polissacarídeos de algas entre outros, os quais podem ativar os mecanismos de defesa e melhorar a sobrevivência dos animais (Brincknell; Dalmo, 2005).

Os polissacarídeos de algas marinhas apresentam resultados promissores no aumento da resistência de camarões marinhos expostos a condições de estresse e a patógenos (Lima *et al.*, 2007).

Sung, Kou e Song (1994), em experimento realizado com *Penaeus monodon*, encontraram alta porcentagem de sobrevivência dos

mesmos contra *Vibrio vulnificus* após os 18 dias de desafio, quando alimentados com um suplemento de 1,3 β -glucano em relação à dieta controle, sem suplementação com 1,3 β -glucano.

Uma solução de laminaranas extraídas da macroalga marrom *Laminaria digitata* aumentou a liberação de anion superóxido de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* (Campa-Cordova *et al.*, 2002).

Chang *et al.* (2003) utilizando a mesma espécie de camarão demonstraram que a suplementação de β -glucano na dieta na concentração de 10 g/kg, durante 20 dias, aumentou significativamente a sobrevivência após desafio com o vírus da síndrome da mancha branca.

Lopez *et al.* (2003), avaliando o efeito da suplementação de diferentes níveis de β -glucano e vitamina C para o camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, em resposta ao estresse, observaram aumento da resistência, ressaltando que tanto o β -glucano quanto a vitamina C agem por meio de diferentes vias de resposta ao estresse.

Em outro estudo, o polissacarídeo sulfatado fucoídano, extraído da macroalga marinha parda *Sargassum polycystum*, reduziu o impacto causado pela infecção com o vírus da mancha branca (WSV) no camarão *Penaeus monodon* (Chotigeat *et al.*, 2004). Os autores reportaram que após a inclusão do fucoídano na dieta dos camarões foi observado um aumento significativo nas taxas de sobrevivência dos animais infectados. Além disso, o extrato bruto do fucoídano foi ainda capaz de inibir o crescimento de três bactérias Gram-negativas: *V. harveyi*, *Staphylococcus aureus* e *E. coli* (Chotigeat *et al.*, 2004).

Os polissacarídeos sulfatados da macroalga *Botryocladia occidentalis* também foram utilizados em pós-larvas do camarão *L. vannamei*, submetidos aos agentes estressores, na forma de banhos de imersão (Barroso, 2005) e incorporados na ração de camarões *L. vannamei* infectados com o Vírus da Mionecrose Infecçiosa (IMNV) (Costa *et al.*, 2006), sendo observado, em ambos os casos, um aumento significativo da sobrevivência dos indivíduos.

Yeh *et al.*, (2006) analisaram que a administração de extrato aquoso obtido a quente da espécie de macroalga *Sargassum duplicatum*, tanto por imersão quanto injeção, aumentou a habilidade imune do camarão *L. vannamei*.

Huang *et al.* (2006) reportaram que o uso oral de polissacarídeo sulfatado extraídos da macroalga marinha parda *Sargassum fusiforme* no camarão *Fenneropenaeus chinensis*, infectado com *V. harveyi*, resultou

em uma maior resistência destes animais à infecção por esta bactéria patogênica.

Os polissacarídeos sulfatados de microalgas também apresentam atividade imunestimulante. Como exemplo, pode ser citada a atividade imunestimulante dos polissacarídeos sulfatados extraídos de uma cianobactéria, *Cyanothece sp.* a qual foi demonstrada por Campa-Cordova *et al.* (2002). Os autores demonstraram que banhos de imersão com estes polissacarídeos promoveram um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase e na produção do ânion superóxido.

Segundo Lee *et al.* (2003), o camarão *Penaeus merguensis*, teve sua resistência aumentada, quando foi alimentado com ração contendo a microalga cianofícea *Spirulina platensis*, devido à ativação da atividade fagocitária dos hemócitos contra quatro bactérias estudadas: *Vibrio harveyi*, *Escherichia coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*. De acordo com os autores, esta atividade imunestimulante está relacionada à presença de lipopolissacarídeos e peptídeoglicanos na microalga *S. platensis*.

A microalga marinha *Porphyridium cruentum* é uma fonte potencial de polissacarídeo sulfatado, durante a fase estacionária de crescimento, esta microalga produz uma quantidade massiva de um exopolissacarídeo que possui, na sua constituição, diferentes açúcares, incluindo xilose, galactose, glicose, manose, arabinose e oligossacarídeos sulfatados (Geresh *et al.*, 2002).

O objetivo deste estudo foi avaliar se camarões alimentados com diferentes concentrações do extrato bruto de polissacarídeos sulfatados da microalga marinha *Porphyridium cruentum* apresentam alterações nos parâmetros hemato-imunológicos e na sobrevivência, após desafio com *Vibrio alginolyticus*.

Não existem na literatura estudos sobre o efeito imunestimulante dos polissacarídeos sulfatado da microalga *Porphyridium cruentum*, sobre o sistema imune de camarões marinhos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato bruto de polissacarídeos sulfatados

O extrato bruto de polissacarídeos foi extraído com uma solução de papaína bruta (30 mg mL⁻¹) em 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM (AcNa) a partir de 5 g. Em seguida, o material foi filtrado e após centrifugação (7.965 × g; 20 min.; 10 °C), os PS presentes na mistura foram concentrados por precipitação com 16 mL de cloreto cetilpiridínio (CCP) a 10%, lavado

(200 mL; CCP 0,05%) e posteriormente dissolvido em 174 mL de NaCl 2 M: etanol absoluto (100: 15; v/v). Logo após uma precipitação com etanol absoluto (24 h; 4 °C), o material foi lavado com etanol 80% (200 mL; 2 ×), etanol absoluto (200 mL; 1 ×) e seco em estufa durante 24 horas a 60 °C (Farias *et al.*, 2000).

Preparação das dietas

Diferentes concentrações de extrato de polissacarídeos da microalga *Porphyridium cruentum* (0,5%, 1,0 %; 1,5% e 2,0%) foram adicionadas a uma ração comercial para camarão marinho (Guabi[®], 40% de proteína bruta e 7,5% de extrato etéreo). A ração foi triturada separada em lotes de 5Kg e cada lote recebeu a uma suplementação referente às concentrações acima especificadas. Os lotes suplementados foram misturados 1 a 1 por 15 minutos em misturador modelo Y. Em seguida a mistura seca foi colocada em uma bateadeira onde foi adicionada água morna em quantidade suficiente para que uma massa consistente fosse formada. Na sequência a massa foi extrusada em um moedor elétrico de carne e os péletes formados foram secos em estufa com circulação de ar a 60°C por 24 h, embalados em sacos plásticos e armazenados a 4°C. O lote de ração sem adição de extrato bruto de polissacarídeo (0%), que serviu como controle, foi submetido aos mesmos procedimentos das demais.

Condições experimentais

Ensaio alimentar

Um total de 2.000 juvenis de camarão branco *Litopenaeus vannamei* com peso inicial de $6,6 \pm 0,2$ g, camarões SPF (*specific pathogen free ou livre de patógenos*), foram distribuídos aleatoriamente em 20 tanques de fibra de vidro (12 m² fundo, quatro tanques por tratamento, 100 camarões por tanque). As cinco dietas experimentais foram designadas aleatoriamente a quatro tanques. Durante 30 dias, os camarões foram alimentados duas vezes ao dia, às 10:00 h e às 17:00 h. Em todos os tratamentos os camarões foram alimentados à vontade.

A renovação diária da água dos tanques foi realizada às 8 h e às 14 h, correspondendo a 50% do volume total de cada tanque.

As variáveis ambientais foram monitoradas durante o experimento, o oxigênio dissolvido, a temperatura e a salinidade foram medidas duas vezes ao dia (oxímetro YSI 55 e refratômetro YSI 30,

respectivamente). A amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) foi analisada a cada 10 dias imediatamente após a coleta em espectrofotômetro LAMOT (smart espectro 2000). As amostras foram previamente filtradas com microfiltros de acetato celulose com porosidade $0,45\mu\text{m}$ (Sartorius). As análises foram realizadas de acordo com Strickland e Parsons (1972).

Após 30 dias de alimentação com as dietas experimentais, os animais foram amostrados aleatoriamente (8 pools de 5 animais por tratamento, $n=40$) para verificação dos parâmetros hematológicos pré-infecção, estes animais foram descartados.

Desafio com *Vibrio alginolyticus*

Quarenta camarões ($13,3 \pm 0,3$ g) de cada tratamento do ensaio alimentar foram transferidos para aquários de 20L (dez animais por aquário e quatro aquários por tratamento) contendo água salgada. Os animais receberam uma injeção no primeiro segmento dorsal com $25\mu\text{L}$ de suspensão de *Vibrio alginolyticus* (5×10^6 UFC/mL). Um grupo de 40 animais (10 animais por aquário) serviu como controle negativo, sendo injetados com $25\mu\text{L}$ de solução salina estéril. A sobrevivência foi avaliada 24 h e 48 h após o desafio. Amostras de hemolinfa dos sobreviventes foram retiradas para a contagem total dos hemócitos (THC) e para determinação da atividade da fenoloxidase (PO).

Preparo do inóculo bacteriano

A bactéria marinha *V. alginolyticus* foi cultivada em meio de cultura líquido de infusão de coração e cérebro (BHI, Oxoid) sob agitação contínua ($200 \times \text{g}$) a 30°C . Após 24h do crescimento da cultura, a suspensão bacteriana foi centrifugada ($2000 \times \text{g}$), o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em solução salina estéril (SSE - 1,5% de NaCl), e a concentração ajustada, após ensaio para verificação da dose letal 50% (DL_{50}), para 10^5 UFC/mL.

Coleta da hemolinfa para preparação do soro

A hemolinfa dos camarões ($n=40$, para cada tratamento) foi coletada na região ventral do primeiro segmento abdominal de cada camarão com seringas estéreis de 1 mL acopladas a agulhas 21G, previamente resfriadas a 4°C , para evitar a coagulação. Foram feitos oito *pools* de

cinco animais por tratamento. Para a preparação do soro, a hemolinfa foi deixada coagular a 4°C por 24h, o coágulo foi então congelado (-20°) e descongelado para permitir a ruptura celular e a liberação do conteúdo dos grânulos, sendo depois centrifugado repetidamente (2.000 x g por 5 min). O sobrenadante, correspondente ao soro (plasma sem coágulo e produtos da exocitose celular), foi alíquotado e congelado a -20°C para uso posterior.

Avaliação dos parâmetros hemato-imunológicos

A contagem total de hemócitos (CTH) foi determinada individualmente em câmara de Neubauer. Para tal, uma amostra de 10 µL de hemolinfa, coletada como acima descrito, foi fixada em 4% de formaldeído em solução de Alsever modificada ou MAS (27 mM citrato de sódio, 336 mM NaCl, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, ph 7,0) a uma diluição conhecida.

A concentração proteica do soro foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se soro-albumina bovina (BSA) como padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A determinação da atividade da enzima pró-fenol oxidase (PO) nas amostras de soro foi realizada colorimetricamente, através da formação do pigmento vermelho-coral DOPA-cromo, proveniente da oxidação do substrato enzimático L-diidroxifenilalanina (L-DOPA, Sigma) pela PO do soro. Amostras de 50 µL de soro previamente diluídos (10x) em TBS-1 (50mM Tris, 336mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 7,4) foram incubadas com volume igual de tripsina (Sigma, 1 mg/mL), indutor da atividade enzimática, durante 5 min a 20°C, em uma microplaca de 96 poços (fundo chato). Nos controles, o indutor ou o soro foram substituídos por um volume equivalente de TBS-1.

Após incubação, os poços receberam 50 µL de L-DOPA (3 mg/mL) e a formação de DOPA-cromo foi quantificada em leitora de microplacas (absorbância a 490 nm), após 5, 10, 20 e 30 min. A atividade enzimática específica da PO foi expressa pela variação da absorbância por minuto e por miligrama de proteína. Uma unidade de atividade enzimática correspondeu ao aumento de 0,001 na absorbância, por min e por miligrama de proteína a 20°C (Soderhall, Hall, 1984). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Análises estatísticas

O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado com cinco níveis de suplementação dietética de extrato de polissacarídeo (0%, 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%), com três repetições para cada tratamento. Os dados referentes às contagens totais de hemócitos e atividade da PO foram transformados para $\log(x+1)$ para normalização (teste de Kolmogorov-Sminof & Lilliefors) e homogeneização das variâncias (teste de Levene). Todos os dados foram analisados por (ANOVA *one-way*) e, quando a análise apontou diferenças estatísticas entre os tratamentos, foi utilizado o teste de Duncan para separação das médias. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Contagem total dos hemócitos

Após os 30 dias de ensaio alimentar (período pré-infecção), não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na CTH entre os tratamentos. Apesar de ter sido observado uma tendência ao aumento da CTH, em especial na dieta contendo 1% de suplementação com o extrato de polissacarídeo em relação ao controle sem suplementação (Tabela 1).

Após a infecção com o *Vibrio alginolyticus* o valor da CTH do camarão diminuiu em todos os tratamentos, mas o tratamento sem polissacarídeo (0% de PS) registrou a queda mais significativa 39,42% na CTH ($18,9 \pm 1,3 \times 10^6$ células ml^{-1}) em relação à pré-infecção ($31,2 \pm 3,4 \times 10^6$ células ml^{-1}) sendo significativamente diferente ($p < 0,05$) dos outros tratamentos suplementados com o extrato de polissacarídeo sulfatado. (Tabela 1). Após o desafio com *Vibrio alginolyticus*, os valores para a atividade da PO aumentaram em todos os tratamentos proporcionalmente às doses crescentes do extrato de polissacarídeo sulfatado (Tabela 1).

Tabela 1. Respostas imunológicas de *L. vannamei* (13,3 ±0,3 g) antes (0 h) e após infecção (48 h) com *Vibrio alginolyticus* (5,0 x 10⁶ CFU)¹

Parâmetros	Tempo h	Controle ²	Suplementação de polissacarídeo sulfatado na dieta, %				
			0	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%
CTH, x 10 ⁶	0	31,2 ±3,4 ^{Aa}	31,2 ±3,4 ^{Aa}	35,3 ±5,3 ^{Aa}	36,9 ±3,6 ^{Aa}	35,2 ±3,6 ^{Aa}	33,2 ±1,8 ^{Aa}
	48	24,4 ±8,1 ^{Bab}	18,9 ±1,3 ^{Bb}	27,3 ±4,8 ^{Ba}	29,7 ±2,7 ^{Aa}	25,6 ±3,6 ^{Ba}	24,8 ±2,9 ^{Bab}
PO, U min ⁻¹ mg ⁻¹	0	77,6 ±14,5 ^{Bb}	77,6 ±14,5 ^{Bb}	83,7 ±10,9 ^{Bab}	96,6 ±13,9 ^{Bab}	102,9 ±9,6 ^{Aab}	108,2 ±13,1 ^{Aa}
	48	135,9±26,6 ^{Ab}	155,7 ±12,4 ^{Ab}	162,7 ±27,5 ^{Ab}	173,6 ±16,6 ^{Aab}	179,2 ±23,8 ^{Aab}	217,4 ±17,1 ^{Aa}

¹ Valores representam médias ± desvio padrão (n = 4).

² Camarões foram injetados com solução salina.

^{A,B} Médias na mesma coluna (para cada parâmetro) com letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas antes e após o desafio (P < 0,05).

^{a,b} Médias na mesma linha (para cada parâmetro) com letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas (P < 0,05).

Sobrevivência

Os animais injetados somente com solução salina (controle do desafio) apresentaram 100% de sobrevivência após 48 h do desafio. Para os demais tratamentos, a taxa de sobrevivência em 48 h foi em média 86% nos tratamentos que receberam suplementação nos níveis 0,5%, 1,0% e 1,5% não havendo diferença estatística entre eles ($p < 0,05$). A menor taxa de sobrevivência em 48 h foi registrada nos animais do grupo controle, sem suplementação de extrato de polissacarídeo (57,5%). O grupo que recebeu a dieta contendo 2% de suplementação com polissacarídeo também apresentou sobrevivência significativamente menor (64,8%), quando comparada aquela apresentada pelos demais grupos (Tabela 2). Para todos os tratamentos, a maior mortalidade ocorreu até 24 h, com exceção do controle sem suplementação, que continuou apresentando uma grande mortalidade entre 24 h e 48 h (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da suplementação dietética crescente do extrato bruto de polissacarídeos da microalga *Porphyridium cruentum* na sobrevivência de juvenis de *Litopenaeus vannamei* (13,3 ± 0,3g) desafiados com *Vibrio alginolyticus* (5,0 x 10⁶ CFU) após 24 e 48 h¹.

Suplementação, %	Taxa de sobrevivência após o desafio, %	
	24 h	48 h
Controle ²	100	100
0	70,0 ± 14,1 ^b	57,5 ± 12,6 ^c
0,5	80,0 ± 11,5 ^{ab}	77,5 ± 9,6 ^{abc}
1,0	90,0 ± 8,2 ^a	90,0 ± 8,2 ^a
1,5	85,0 ± 10,0 ^{ab}	82,5 ± 9,6 ^{ab}
2,0	69,8 ± 13,8 ^b	64,8 ± 12,4 ^{bc}

¹Valores das médias ± desvio padrão.

² Camarões alimentados com a dieta sem suplementação e injetados somente com solução salina.

^{a,b} Médias com letras sobrescritas diferentes em cada coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Atualmente a busca por substâncias que melhorem a imunocompetência dos camarões marinhos desponta como uma alternativa interessante, uma vez que estes animais não podem ser vacinados. Na literatura existem alguns relatos sobre a ação estimulante de polissacarídeos de algas sobre a imunidade de camarões cultivados, levando a um aumento na resistência a vibrioses.

Sung, Kou e Song (1994), em experimento realizado com *Penaeus monodon*, encontraram alta porcentagem de sobrevivência dos mesmos contra *Vibrio vulnificus* após os 18 dias de desafio, quando alimentados com um suplemento de 1,3 β -glucano em relação à dieta controle, sem suplementação com 1,3 β -glucano.

Em outro estudo, os autores reportaram que após a inclusão do fucoidana na dieta dos camarões foi observado um aumento significativo nas taxas de sobrevivência dos animais infectados. Além disso, o extrato bruto do fucoidana foi ainda capaz de inibir o crescimento de três bactérias Gram-negativas: *V. harveyi*, *Staphylococcus aureus* e *E. coli* (Chotigeat *et al.*, 2004).

Yeh *et al.*, (2006) analisaram que a administração de extrato aquoso obtido a quente da espécie de macroalga *Sargassum duplicatum*, tanto por imersão quanto injeção, aumentou a habilidade imune do camarão *L. vannamei*.

Huang *et al.* (2006) reportaram que o uso oral de polissacarídeo sulfatado extraídos da macroalga marinha parda *Sargassum fusiforme* no camarão *Fenneropenaeus chinensis*, infectado com *V. harveyi*, resultou em uma maior resistência destes animais à infecção por esta bactéria patogênica.

Segundo Lee *et al.* (2003), o camarão *Penaeus merguensis*, teve sua resistência aumentada, quando foi alimentado com ração contendo a microalga cianofícea *Spirulina platensis*, devido à ativação da atividade fagocitária dos hemócitos contra quatro bactérias estudadas: *Vibrio harveyi*, *Escherichia coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*. De acordo com os autores, esta atividade imunoestimulante está relacionada à presença de lipopolissacarídeos e peptídeoglicanos na microalga *S. platensis*.

No presente estudo, o efeito imunoestimulante do extrato bruto de polissacarídeos sulfatados da microalga marinha *Porphyridium*

cruentum foi avaliado sobre o sistema imune de juvenis de *Litopenaeus vannamei*, experimentalmente infectados com uma cepa patogênica de *Vibrio alginolyticus*.

As células imunocompetentes ou hemócitos são os principais sítios de síntese das moléculas imunológicas dos camarões (Gross *et al.*, 2001), estando diretamente envolvidos com a fagocitose, a formação de nódulos e cápsulas e a produção e liberação de moléculas citotóxicas e líticas, capazes de eliminar os agentes invasores (Millar; Ratcliffe, 1994). Neste estudo, as CTH não apresentaram diferença significativa após 30 dias de ensaio alimentar (pré-infecção). Após a infecção com o *Vibrio alginolyticus*, todos os tratamentos tiveram uma redução na CTH, mas o tratamento controle sem suplementação com extrato de polissacarídeo sulfatado registrou uma queda de 39,42% na CTH, sugerindo que a alimentação suplementada com o extrato de polissacarídeo da microalga deve ter auxiliado, de alguma forma, na manutenção da quantidade de hemócitos circulantes nos camarões infectados.

Este resultado parece estar associado a uma resposta inflamatória dos hemócitos que migram para a região da inoculação, saindo assim da circulação (Lorenzon, 2001, Van de brack *et al.*, 2002b). Adicionalmente, os hemócitos podem se agregar em nódulos hemocíticos, onde atuam moléculas de adesão celular como peroxinectina, que aprisionam micro-organismos em seu interior (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006) e que podem ser retirados de circulação pelas brânquias por processos mecânicos.

Os hemócitos também podem se fixar em outros órgãos como o hepatopâncreas (Alday-Sans *et al.*, 2002). Neste estudo, observou-se que a queda na contagem de hemócitos dos camarões alimentados com as dietas suplementadas com extrato de polissacarídeo foi inferior a dos animais do tratamento controle sem suplementação. Este resultado pode estar associado a uma reposição mais rápida dos hemócitos na circulação pelo tecido hematopoiético (Van de Brack *et al.*, 2002a) dos camarões alimentados com o extrato de polissacarídeo. Relatos na literatura sobre a ação imunoestimulante de polissacarídeos sulfatados sobre a CTH de camarões são muito controversos e de difícil comparação, principalmente porque as metodologias de uso e os polissacarídeos são diferentes.

Outro potente mecanismo imunoefetor em crustáceos é o sistema de ativação da pró-fenoloxidase (proPO) geralmente ativado durante a formação de nódulos ou cápsulas onde se forma um precipitado escuro ou melanização. A enzima chave deste processo é a fenoloxidase (PO),

que se encontra armazenada na forma inativa proPO nos grânulos de hemócitos. Quando liberada, a PO dá origem a uma cascata de reações químicas que resulta na produção de melanina e na formação de compostos intermediários altamente tóxicos que destroem os microorganismos invasores (Costa, 2007). No presente estudo, a atividade da PO se alterou significativamente entre período pré e pós-infecção. A ativação deste sistema pode ser desencadeada por componente da superfície de microorganismos, tais como os lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias Gram negativas, as peptidoglicanas de bactérias Gram-positivas e as b-1, 3-glicanas da superfície de fungos (Cerenius e Soderhall, 2004). Após o 30º dia do ensaio alimentar, foi observado que a atividade da PO era maior quanto maior a suplementação com o extrato de polissacarídeo. Muitos autores relacionam a atividade da PO ao número de hemócitos, mais precisamente os granulares, pois estes carregam as moléculas imunoefetoras (Johansson *et al.*, 2000).

Neste estudo, no período pré-infecção, os maiores valores da CTH foram registrados com a suplementação de 1% de polissacarídeos, não sendo compatível com o comportamento da PO que continuou aumentando proporcionalmente ao aumento dos níveis de extrato de polissacarídeo.

Alguns autores já demonstraram que o sistema proPO está relacionado ao reconhecimento do não próprio em artrópodos (Soderhall; Cerenius, 1998, Vargas-Albores, 1995 – SODERHALL CRUSTÁCEOS E UM INSETO RATCLIFF). Isto sugere que o comportamento da atividade da PO tenha sido causado pelo próprio extrato de polissacarídeo, mais precisamente pelas regiões sulfatadas, que são carregadas negativamente e, quando reconhecidas, ativam o sistema proPO. (Damonte *et al.*, 2004). Esta interação já foi demonstrada entre as glicoproteínas presentes no envelope viral e os polissacarídeos sulfatados (Damonte *et al.*, 2004).

Inúmeros trabalhos relatam mudança nas atividades da PO em camarões submetidos a tratamentos com imunoestimulantes, após desafios (Xuxiong *et al.*, 2006, Yeh *et al.*, 2006).

A sobrevivência após a infecção com *Vibrio alginolyticus* foi significativamente maior (90% dos animais sobreviveram) no tratamento que recebeu 1% de suplementação com o extrato de polissacarídeo, sugerindo que a suplementação dietética com polissacarídeo sulfatado aparentemente foi eficaz no aumento da

imunocompetência do camarão *Litopenaeus vannamei*, contribuindo para o aumento da sobrevivência destes animais.

A partir de 1,5% de suplementação dietética, a sobrevivência diminuiu. Sakai (1990) afirma que baixas doses de polissacarídeos sulfatados produzem uma melhor resposta em relação à sobrevivência, sendo o efeito dos imunostimulantes diretamente dependente de uma dose ideal.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o extrato bruto de polissacarídeo da microalga marinha *Porphyridium cruentum* adicionado à dieta na faixa entre 0,5% a 1,5% de suplementação foi capaz de aumentar a imunocompetência de juvenis de *Litopenaeus* além de aumentar significativamente a sua sobrevivência. Todavia outros imunoparâmetros, além de estudos da expressão de proteínas imunológicas devem ser avaliados visando à confirmação deste resultado. Estudos futuros devem ser feitos visando esclarecer o mecanismo de ação deste extrato de polissacarídeo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos responsáveis técnicos e aos alunos do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM-UFSC) pelo apoio logístico na realização do experimento e das análises imunológicas.

REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO 3

Alday-Sanz, V., Roque, A., Turnbull, J. F. Clearing mechanisms of *Vibrio vulnificus* biotype in the black tiger *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Org., 48, 91-99, 2002.

Bachère, E. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture, v. 191, p. 3-11, 2000.

Barroso, F. E. C. O. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* (Rhodophyta, Rhodyme'niales) na sobrevivência de pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*, adaptadas em águas oligohalinas. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* v. 72, p. 248-254, 1976.

Bricknell, I.; Dalmo, R. A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol*, 19, 457 – 472.

Campa-Córdova, A. I.; Hernández-Saavedra, N. Y.; Philippis, R.; Ascencio, F. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulfated polysaccharide. *Fish & shellfish immunology.* v. 12, p. 353-366, 2002.

Cerenius, L., Söderhäll, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev*, 198, 116-12, 2004..

Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., Liao, I.C. Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 15, 297-310, 2003.

Chotigeat, W. A. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture.* Amsterdam, v. 233, p. 23-30, 2004.

Costa, A. M. Parâmetros hemato-imunológicos em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* durante o avanço da infecção pelo vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). 2006. 68f. Dissertação (Pós-graduação em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

Geresh, S.; Mamontov, A.; Weinstein, J. Sulfatation of extracellular polysaccharide of red microalgae: preparation, characterization and properties. *J Biochem Bioph Meth*, v.50, p.179-187, 2002.

Gomez-Gil, B.; Roque, A.; Turnbull, J. F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, v. 191, n. 1-3, p. 259-270, Nov 20 2000.

Gross, P. S., Barlett, T. C., Browdy, C. L., Champman, R.W., Warr, G. W. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of

hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. Setiferus*. Dev. Comp. Immunol, 25, 565-577, 2001.

Hsu, S. W.; Chen, J. C. The immune response of the white shrimp *Penaeus vannamei* and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress. Aquaculture, 271, 61-69.

Huang, X.; Zhou, H.; Zhang, H. The effect of Sargassum fusiforme polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Fish Shellfish Immunol, 20, 750-757, 2006.

Jiravanichpaisal, p.; Lee, B. L.; Söderhall, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology, v. 211, p. 213-236, 2006.

Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Soderhall, K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture, 191, 45-52, 2000.

Le Moullac, G.; Haffner, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture, 191: 121-131, 2000.

Lee, Y.; Chew, P.; Soh, B.; Tham, L. Y. Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus merguensis* by feeding *Spirulina platensis*. Journal of applied phycology, n.279, v. 15, p. 279-287, 2003

Lima, P. W. C. Efeito do polissacarídeo sulfatado da alga marinha parda *Spatoglossum schoederi* sobre o aumento da resistência do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* submetido a situação de estresse. 2007. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

Lopez, N. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. Aquaculture, v. 224, p. 223-243, 2003.

Lorenzon, S. *et al.* Heavy metals affect the circulating haemocyte

Millar, D. A., Ratcliffe, N. A. Invertebrates. In: Turner, R. j. (Ed), Immunology: a comparative approach. New York, 30-66, 1994.

Rengpipat, S.; Rukpratanporn, S.; Piyatiratitivorakul, S.; Menasaveta, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival growth. *Aquaculture*, v. 167, p.271-288, 2000.

Sakai, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. v. 172. p. 63–92, 1999.

Sarathi, M.; Ahmed, V. P. I.; Venkatesan, C.; Balasubramanian, G.; Prabavathy, J.; Hameed, A. S. S. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*, v. 271, p. 8-20. 2007.

Smith, V.; Brown, J. H.; Hauton, C.,2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? *Fish Shellfish Immunol*, 15: 71-90.

Soderhall, K., Cerenius, L. Role of the prophenoloxi- daseactivating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 10, 23-28, 1998

Sritunyalucksana, K.; Söderhall, K. The proPO and clotting system in crustaceans, *Aquaculture*, 191: 53-69, 2000.

Strickland, J. D. H.; Parsons, T. R. A practical handbook of seawater analysis *Bulletin Fisheries Research board of Canada*, Ottawa, n. 167, p. 1- 205, 1972.

Sung, H.H.; Kou, G.H.; Song, Y.L.. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish pathology*, v. 29, p.11-17, 1994

Van de Braak, C. B., Botterblom, M. h., Liu, W., Taverne, N., Van Muiswinkel, W. B., Rombout, j. H. W. M., Van der Knapp, W. P. W. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp, *Fish Shellfish Immunol*, 13, 293-309, 2002a.

Van de Braak, C. B., Botterblom, M. h., Liu, W., Taverne, N., Van Muiswinkel, W. B., Rombout, j. H. W. M., Van der Knapp, W. P. W.

Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 51, 149-155, 2002b.

Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Söderhäll, K. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. *Develop. Comp. Immuno*, 20, 299-306, 1996.

Xuxiong, H., Zhou, H., Zhang, H., 2006. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extract on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, *Fish Shellfish Immun.*, 20, 750-757.

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 the white shrimp *Litopenaeus vannamei*, *Fish Shellfish Immun.*, 20, 332-345.

CONCLUSÕES GERAIS

- a) A suplementação de extrato bruto de polissacarídeo sulfatado na dieta provoca o aumento do ganho em peso em juvenis de *L. vannamei*.
- b) O extrato bruto de polissacarídeo sulfatado não é tóxico nas concentrações testadas e não causa mortalidade aos animais.
- c) A melhor concentração para suplementação de extrato bruto de polissacarídeo é 1 % para o ganho.
- d) O carreamento das enzimas do hepatopâncreas para o intestino aconteceu nas dietas que foram suplementadas, porém para que a digestão dos nutrientes da dieta seja otimizada, esta suplementação não deve passar de 1%.
- e) A alimentação dos camarões durante 30 dias com suplementação de polissacarídeos aumentou a CTH e a atividade da PO, indicando imunoestimulação.
- f) A suplementação com o polissacarídeo sulfatado na concentração de 1% proporciona uma taxa de sobrevivência de 90% dos animais após 48 h da infecção por *Vibrio alginolyticus*.
- g) De acordo com as concentrações testadas neste estudo, à faixa de suplementação de polissacarídeos na dieta, visando otimizar o ganho em peso e a resistência imunológica dos camarões juvenis de *Litopenaeus vannamei* deve estar entre 1% a 1,5%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade do alimento oferecido aos animais certamente contribui para um bom estado nutricional e conseqüentemente uma melhor condição imunológica. Os resultados demonstraram que a suplementação com o extrato de polissacarídeo sulfatado da microalga *Porphyridium cruentum* é uma alternativa para tornar o camarão marinho mais resistente a uma situação de enfermidade. Estudos para verificar, outras formas de administração deste extrato de polissacarídeo sulfatado, a utilização deste composto em larviculturas, a relação entre o ganho em peso e a distribuição das enzimas, devem ser considerados. É importante também a realização de estudos para avaliar a viabilidade de reproduzir esta suplementação em escala comercial.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABRAHAMA, T. J.; PALANIAPPAN, R. Distribution of luminous bacteria in semi-intensive penaeid shrimp hatcheries of Tamil Nadu, India, **Aquaculture**, v.232, p.81-90, 2004.
- ARAD, S.; LEVY-ONTMAN, O. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. **Current opinion in Biotechnology**, v.21, p.358-364, 2010.
- ASPINALL, G.O. **Polysaccharides**. Ed. Pergamon Press, Oxford. 228p, 1970.
- BACHÈRE, E. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. **Aquaculture**, v. 227, p. 427-438, 2003.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M; ROSA, R. D. Inmunologia de crustáceos, con énfasis en camarones. In: (eds) CYTED. **Patología y Inmunología del camarón blanco *Penaeus vannamei***. Panamá, 2008.
- BARRACO, M.A. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. In: RANZANI-PAIVA, TAKEMOTO, R., LIZAMA, M. **Sanidade de organismo aquáticos**, São Paulo: Ed. Varela, p. 51-74, 2004.
- BARROSO, F. E. C. O. **Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* (Rhodophyta, Rhodymeniales) na sobrevivência de pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*, adaptadas em águas oligohalinas**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- BECKER, A.G. **Utilização de organismos-alimento na larvicultura do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacia, Brachyura, Ocypodidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BELAY, A. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**. v.5, p.235-240, 1993.

BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **B. CEPPA**. v. 26, n. 1, 2008.

BOHN, J.A.; BeMILLER, J.N. (1-3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**. v. 28, p. 3-14, 1995.

BOISSON-VIDAL, C. A. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs of the future**. v. 20, n. 12, p. 1237-1249, 1995.

BORGES, L.; FARIA, B.M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P.C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um "Mecanismo de Desenvolvimento Limpo". **Atlântica**, Rio Grande. v. 29, n. 1, p. 35-46, 2007.

BOROWITZA, M.A. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, n. 5, p. 393-401, 1997.

BRICKNELL, I.; DALMO, R. A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & shellfish immunology**, v. 19, p.457 - 472, 2005.

BROWN, M.R.; JEFFREY, S.W.; VOLKMAN, J.K.; DUNSTAN, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v. 151 p.315-331, 1997.

BUCELLI, P.; GARCIA, F. O vírus da síndrome da mancha branca. **Pan. Aquic.**, v.15, p. 43-49, 2005.

CALVACANTI, F. A. A. **Novos arranjos produtivos:**a carcinicultura nos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte, 2003. 168 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

CAMARGO, S. G. O.; POUHEY, J. L. O. F. Aquicultura - um mercado em expansão. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 393-396, out-dez, 2005.

CAMPA-CÓRDOVA, A. I.; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N. Y.; PHILIPPIS, R.; ASCENCIO, F. Generation of superoxide anion and

SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulfated polysaccharide. **Fish & shellfish immunology**, v. 12, p. 353-366, 2002.

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

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

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

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

COOK, M. T. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, v.14, n.4., p.333-345, 2002.

COSTA, F. H. F.; FARIAS, W. R. L.; SAMPAIO, A. H.; ROCHA, I. R. C. B.; PONTES, G. C.; SILVA, C. M.; da SILVA NETO, J. F.; da SILVA, F. L. S.; NUNES, E. V.; de SOUZA, A. L. F.; LIMA-JUNIOR, T. B. Enhancement of disease resistance against infectious myonecrosis virus (IMNV) of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* by sulfated polysaccharide extracts from the red seaweeds *Botryocladia occidentalis* and *Solieria filiformis*. In: III Simpósio Internacional sobre a indústria do camarão cultivado. Natal, 2006. **Anais...**Natal: 2006.

DALMO, R.A.; BOGWALD, J.; INGEBRIGTSEN, K.; SELJELID, R. The immunomodulatory effect of laminaran [β (1,3)-D-glucan] on

Atlantic salmon, *Salmo salar* L., anterior kidney leucocytes after intraperitoneal, peroral and peranal administration. **Journal of Fish Disease**. v.6. n.19, p. 449-457, 1996.

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

FAO. The state of world fisheries and aquaculture. In: **SOFIA 2012**. Rome: FAO, 2012. 207p.

FARIAS, W.R.L. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **Journal Biological Chemistry**, 38, 29299-29307, 2000.

FRANCESCHINI, I.M.; BURLIGA, A.L.; REVIERS, B.; PRADO, J.F.; RÉZIG, S.H. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. 332p. Artmed, Porto Alegre, 2010.

FROTA, I. L. N. Desenvolvimento regional por meio dos clusters: o caso da indústria do camarão no nordeste. In: SIMPÓSIO DE ENGENHARIA E PRODUÇÃO, 13., 2006. Bauru. **Anais...** Bauru: UNESP, Brasil, 2006.

GERESH, S.; ARAD, S.; LEVY-ONTMAN, O.; ZHANG, W.; TEKOA, Y.; GLASER, R. Isolation and characterization of poly and oligosaccharides from the red microalga *Porphyridium sp.* **Carbohydrate Research**, v.344, p.343-349, 2009.

GRANUM, E. e MYKLESTAD, S.M. A simple combined method for determination of β -1,3-glucan and cell wall polysaccharides in diatoms. **Hydrobiologia**. v. 477, p. 155–161, 2002.

HANNESSON, R. Aquaculture and fisheries. *Marine Policy*, v. 27, p. 169-178, 2003.

HUANG, X.; ZHOU, H.; ZHANG, H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune

activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish e Shellfish immunology**, v. 20, p. 750-757, 2006.

HULEIHEL, M.; ISHANU, V.; TAL, J.; ARAD, S. Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on *Herpes simplex* and *Varicella zoster* viruses. **Journal of Applied Phycology**, v.13, p.127-134, 2001.

In: RANZANI-PAIVA, TAKEMOTO, R., LIZAMA, M. **Sanidade de**

JIANG, S. Aquaculture, capture fisheries and wild fish stocks. **Resource And Energy Economics**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p.65-77, 2010.

JURGENFELD, V. Suspeita de vírus em camarão de SC. **Valor Econômico**, São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://www.agribands.com.br>>. Acesso em: 10 setembro.2008.

KAUTSKY, Y. P.; RÖNBÄCK, M.; TEDENGREN E TROELL, M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145-161, 2000.

LE MOULAC, G., HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, v. 191, p. 121-131, 2000.

LEE, Y.; CHEW, P.; SOH, B.; THAM. L. Y. Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus merguensis* by feeding *Spirulina platensis*. **Journal of applied phycology**, n.279, v. 15, p. 279-287, 2003.

LIMA, P. W. C. **Efeito do polissacarídeo sulfatado da alga marinha parda *Spatoglossum schoederi* sobre o aumento da resistência do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* submetido à situação de estresse**. 2007. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

LIU, C. H.; CHEN, J. C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*, **Fish & Shellfish immunology**, v.16, p. 321-334, 2004.

LOPEZ, N. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture**,v. 224, p. 223-243, 2003.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos, SP: Rima Editora. 2006.

MADRID, R. M. Análise das exportações da carcinicultura brasileira de 1999 a 2003: cinco anos de sucesso e, 2004, o início de uma nova fase. **Revista da ABCC**, v.1: p.76-84, 2005.

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

NAPPI, A.J.; VASS, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. **Pigment Cell Research**, v.6, p.117-126, 1993.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P.C. Avaliando o estado de Saúde de Camarões Marinhos na Engorda. **Revista Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, vol. 12, p. 23-33, 2002.

NUNES, A. J. P; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carinicultura ameaçada: produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 14, p. 37-51, 2004.
organismo aquáticos, São Paulo: Ed. Varela, 2004, p. 51-74.

PASHARAWIPAS, T.; THAIKUA, S.; SRIURAIRATANA, S.; RUANGPAN, L.; DIREKBUSARAKUM, S.; MANOPVISETCHAREAN, J.; FLEGEL, T. W. Partial characterization of a novel bacteriophage of *Vibrio harveyi* isolated from shrimp culture ponds in Thailand, **Virus Research**, v.14, p. 63-69, 2005.
Phaeocystis globosa. **Journal of Sea Research**, v. 43, p. 297–306, 2000.

PULZ, O. e GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v..65, n.6, p.635-648, 2004.

REBOUÇAS, H. J. Efeito da adição do polissacarídeo sulfatado da alga marinha *Botryocladia occidentalis* na ração de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, submetidos à reversão sexual. In: XII **Simpósio Brasileiro de Aquicultura**, 2002, Goiânia. **Anais...** Goiânia: 2002, p 0-2.

RIJSSEL, M.V.; JANSEB, I.; NOORDKAMPB, D.J.B.; GIESKESA, W.W.C. An inventory of factors that affect polysaccharide production by ROCHA, I. P.; RODRIGUES, J. O agronegócio do camarão cultivado em 2003. Recife: **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC)**, Recife, 20p. 2004.

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

SEIFFERT, W. Q.; BELTRAME, E.; ANDREATTA, E. R.; MAGGIONI, D. S. Enfermidades: uma oportunidade para repensar o cultivo de camarões marinhos. **Panorama da aqüicultura**, Rio de Janeiro, v.16, n.97, p.32 -39 2006.

SKJERMO, J., VANDSTEIN, O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae, **Aquaculture**, v.177, p. 333-343, 1999.

SKJERMO, J; STORSETH, T. R.; HANSEN, K.; HANDA, A., OIE G. Evaluation of β -(1→3, 1→6)-glucans and High-M alginate used as immunostimulatory dietary supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*L.) **Aquaculture**, v. 261, p. 1088-1101, 2006.

SMITH, V.; BROWN, J. H.; HAUTON, C., Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 0, p.1-20, 2003.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v.1, p.23-28, 1998.

SONG, Y. L., CHENG, W., WANG, C. H., Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infectious for culture shrimp in Taiwan, **Journal Invertebrates Pathology**, 61, 24-31, 1993.

SONG, Y. L.; YU, C. I.; LIEN, T. W.; HUAN, C. C.; LIN, M. N. Haemolymph parameters of pacific white shrimp (*Litopenaeus*

vannamei) infect with Taura syndrome virus. **Fish Shellfish Immunology**. V. 14, p. 317-331, 2003.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSEN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Comercial applications of microalgae: Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 101, n.2, 87-96, 2006.

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

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*). In: International Symposium on Tilapia Aquaculture, 5th, 2000, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: 2000, v. 2, p. 524-532.

UTEX. *Porphyridium cruentum*. Disponível em: <<http://web.biosci.utexas.edu/utex/default.aspx>>. Acesso em: 17 set. 2013.

Van de BRAAK, CBT; BOTTERBLOM, M.H.A.; TAVERNE, N.; van der KNAAP, W.P.W.; ROMBOUT, J.H.W.M. The role of haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish and Shellfish immunology**, 12:253-272, 2002.

VANDENBERGHE, J., VERDONCK, L., LI, J., SORGELOOS, P., XU, H. S., Swings, J. Vibrios associated with *Penaeus chinensis*/ Crustacea: Decapoda larvae in Chinese shrimp hatcheries, **Aquaculture**, 169, 121-132, 1998.

VÁZQUEZ, J. A.; GONZÁLEZ, M. P.; MURADO, M. A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish.

VIDOTTI, E.C. e ROLLEMBERG, C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**. v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VIEIRA, F. N., PEDROTTI, F. S., BUGLIONE, C. C., MOURIÑO, J. L. P., BELTRAME, E., MARTINS, M. L., RAMIREZ, C., VINATEA, L. A. Effect of use of acid-lactic probiotic bacterias in the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hatchery survival and microbiology of the water and larvae. **Brazilian journal oceanograph**. v.55 n.4, 2007.

WANG, Y. B; XU, Z. R; XIA, M. S. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. **Fisheries science**, v. 71, p. 1036 – 1041, 2005.

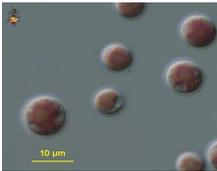
YEH, S.T.; LEE, C.S.; CHEN, J.C. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology** . v. 20, p. 332-345, 2006.

APÊNDICE

Os polissacarídeos de algas como imunestimulantes

PS	Espécie	via	Efeito	Referência
β -1,3 glucano	<i>P. monodon</i>	imersão	aumentou a capacidade de coagulação e sobrevivência desafio com <i>Vibrio</i> ;	Dugger e Jory (1999)
β -1,3 glucano	<i>P. monodon</i>	dieta	aumentou a sobrevivência após desafio WSSV	Chang et al. (2003)
β -glucano	<i>P. monodon</i>	dieta	aumento na sobrevivência	Sung e Hsieh (1994)
β -1,3 glucano	<i>L. vannamei</i>	dieta	aumento na resistência frente a situações de estresse	Lopez et al. (2003)
PS de <i>B. occidentalis</i>	<i>L. vannamei</i>	imersão	aumento na resistência após desafio com IMNV	Barroso et al. (2005)
PS de <i>B. occidentalis</i>	<i>L. vannamei</i>	dieta	aumento na resistência após desafio com IMNV	Costa et al. (2006)
PS de <i>S. platensis</i>	<i>P. merguensis</i>	dieta	ativação da atividade fagocitária dos hemócitos	Lee et al. (2003)
PS <i>S. fusiforme</i>	<i>F. chinensis</i>	dieta	maior resistência destes animais à infecção por <i>V. harveyi</i> ;	Huang et al. (2006)
PS <i>Halymenia</i>	<i>L. vannamei</i>	imersão	aumento sobrevivência	Rodrigues (2006)
<i>S. duplicatum</i>	<i>L. vannamei</i>	imersão e injeção	aumentou a capacidade de coagulação e sobrevivência desafio com <i>Vibrio</i> ;	Yeh et al. (2006)
<i>G. amansii</i>	<i>L. vannamei</i>	dieta imersão e injeção	aumentou a sobrevivência após desafio <i>Vibrio</i>	Fu et al. (2007)
<i>S. polycystium</i>	<i>P. monodon</i>	dieta	aumento na sobrevivência após desafio com WSSV	Chotigeat et al. (2004)
β -1,3 glucano	<i>P. monodon</i>	dieta	aumento na resistência desafio <i>Vibrio vulnificus</i>	Sung et al. (1994)
PS de <i>Cyanothecce sp.</i>	<i>L. vannamei</i>	imersão	ativação da atividade da enzima superóxido dismutase	Campo-Cordova et al. (2002)

Materiais e métodos
 Cultivo de *Porphyridium cruentum*
 Obtenção do extrato bruto de polissacarídeos
 Local: Laboratório de Cultivo de Algas – LCA/UFSC



<http://starcentral.mbl.edu/microscope/portals.php?pagetitle=assetfactsheet&imageid=674>

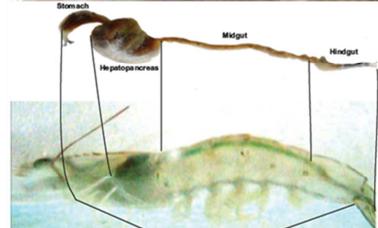
Materiais e métodos
 Elaboração das dietas
 Local: Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas – LABNUTRI/UFSC



Materiais e métodos
Ensaio de Crescimento – Unidades experimentais
Local: Laboratório de Camarões Marinhos – LCM/UFSC



Materiais e métodos
Ensaio de Crescimento – Manejo, biometrias e coleta das porções do trato
Local: Laboratório de Camarões Marinhos – LCM/UFSC



Materiais e métodos
 Infecção experimental
 Local: Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos – AQUOS/UFSC



Materiais e métodos Coleta de hemolinfa

Local: Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos – AQUOS/UFSC

Primeiro segmento abdominal

8 pools de 5 animais/tratamento

Hemolinfa - parte deixada coagular (soro) e parte foi fixada (THC)

Preparação do soro:

Coágulo congelado a -20°C e descongelado

Coágulo centrifugado ($2.000\text{g} - 5\text{min}$)

Soro congelado -20°C para uso posterior (PO)

