



Análises bioquímicas do músculo de camarões *Litopenaeus vannamei* tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofíceia *Halymenia pseudofloresia* Collins & M. Howe em manejo profilático

Muscle biochemical analyses of *Litopenaeus vannamei* shrimps treated with sulfated polysaccharides from Rhodophyceae *Halymenia pseudofloresia* Collins & M. Howe thought a prophylactic management

José Ariévilto Gurgel Rodrigues*, Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante, Daniel Barroso de Alencar & Wladimir Ronald Lobo Farias¹

¹Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará - UFC

*Email: arieviloengpesca@yahoo.com.br

Recebido: 16 de junho de 2016 / Aceito: 24 de junho de 2016 / Publicado: 30 de julho de 2017

Resumo Polissacarídeos sulfatados (PSs) extraídos da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*, arribada na praia cearense de Flecheiras, podem apresentar efeitos redutores do estresse em camarões juvenis de *Litopenaeus vannamei*. Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito da administração dos PSs de *H. pseudofloresia* na água doce de cultivo de camarões adultos *L. vannamei* e analisar bioquimicamente o músculo dos animais após indução ao estresse. Os PSs foram extraídos consecutivamente com papaína em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM, cujo rendimento total foi de 63,94%. Camarões (8 g) foram obtidos de uma fazenda comercial, submetidos à aclimatação em laboratório e, em seguida, estocados (0,3 camarão L⁻¹) durante 20 dias em aquários de 38 L. O bioensaio constou de dois tratamentos com quatro repetições cada um: T1 (controle) s/PSs e T2 1,0 mg L⁻¹ de PSs, os quais foram administrados duas vezes ao dia após a renovação da água de cultivo dos animais. No 16^o dia, a suspensão dos PSs e renovação de água dos aquários gerou uma condição de estresse que resultou numa sobrevivência de 37,5% (p < 0,05) contra 100% de mortalidade dos animais do grupo controle que não receberam PSs. Quando submetidos à extração de PSs a partir do músculo, as análises bioquímicas realizadas por fracionamento em coluna de DEAE-celulose e por eletroforese em gel de agarose sugeriram que os compostos foram absorvidos pelos animais. Portanto, a uso de quantidades baixas dos PSs de *H. pseudofloresia* na água doce de cultivo melhoram a sobrevivência de adultos de *L. vannamei*, quando expostos à condição de estresse.

Palavras-chave: camarão aclimatado, densidade de estocagem, polianiónicos, estresse, sobrevivência.

Abstract. Sulfated polysaccharides (SPs) from the red seaweed *Halymenia pseudofloresia* delivery on the shores of the Flecheiras beach, Ceará, were shown to reduce the stress in *Litopenaeus vannamei* juvenile's shrimps. The aim of this study was to evaluate the effect of administration of the SPs from *H. pseudofloresia* in water cultivation of *L. vannamei* adult shrimps and analyze biochemically the animals' muscle after stress induction. SPs were consecutively extracted with papain in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA, whose total yield was 63.94%. Shrimps (8g) were obtained from a commercial farm, submitted to acclimation in laboratory and, then stocked (0.3 shrimp L⁻¹) for 20 days in 38 L aquariums. The bioassay consisted of two treatments with four replications each one, T1 (control) without SPs and T2 1.0 mg L⁻¹ of SPs, which were administrated twice per day after water renovation of animal cultivation. At the 16th day, the suspension of SPs and the aquarium water renovation generated a stress condition, which resulted in an animal survival rate of 37.5% (p < 0.05) against 100% animal mortality rate from the control group that did not receive SPs. When submitted to a SPs extraction from the muscle, the biochemical analyses performed by fractionating on DEAE-cellulose and by agarose gel electrophoresis suggested that the compounds were absorbed by animals. Therefore, the use of low amounts of SPs from *H. pseudofloresia* in water cultivation increases the survival of *L. vannamei* adults, when exposed under stress conditions.

Keywords: acclimated shrimp, stocking density, polyanionics, stress, survival.

Trabalho realizado com apoio financeiro da Capes/CNPq/MCT.

ISSN: 2357-8068

Indexadores: Sumários (www.sumarios.org) - Diretórios: Diadorim (Diadorim.ibict.br) - Latindex (www.latindex.org)

Introdução

Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) é um peneídeo marinho que tem distribuição geográfica da costa do Panamá até Tumbes, norte do Peru (Perez-Farfante & Kensley, 1997). É cultivada em diversos países do mundo, especialmente no Nordeste do Brasil (Rocha & Rodrigues, 2004), onde as condições geográficas e climáticas são muito favoráveis para o seu cultivo (Barraco, 2004), não apenas em áreas costeiras, mas também em águas oligohalinas, nas quais também vêm ocorrendo a sua produção comercial (Valença & Mendes, 2004).

A resposta imunológica de camarões frente às enfermidades representa uma barreira para o desenvolvimento de estratégias profiláticas mais eficazes na prevenção do estresse, uma vez que os fatores que determinam o estado de saúde desses animais ainda são praticamente desconhecidos (Barraco, 2004). Destes fatores, destacam-se as práticas intensivas de manejo (altas densidades populacionais, por exemplo) e outras formas de manifestações do estresse, ocasionadas pelas variações de temperatura, salinidade e impactos ambientais, através de fenômenos de eutrofização, tornando os animais vulneráveis aos micro-organismos patogênicos e causando doenças (Vadstein, 1997; Gesteira, 2006). O emprego inadequado de antibióticos também acarreta seleção microbiana, favorecendo riscos à atividade e a saúde do consumidor (Figueiredo, Godoy & Leal, 2008). Em adição, a expansão da atividade favorece o surgimento de doenças, principal fator limitante para o sucesso da carcinicultura mundial.

Os imunostimulantes são conhecidos por suas ações na indução do crescimento em camarões (Azad et al., 2005), no monitoramento de doenças infecciosas ocasionadas pelo estresse que debilitam o sistema imune (Alday-Sanz, 2007), na ativação da fagocitose e atividade das células de defesa contra patógenos e seus metabólitos (Sakai, 1999; Campa-Córdova, Hernandez-Saavedra, Philipps & Ascendio, 2002), que levam a um melhor desempenho zootécnico e/ou sobrevivência, trazendo benefícios à saúde dos animais aquáticos (Sakai, 1999; Bricknell & Dalmo, 2005; Lima, 2007; Araújo, Farias, Rodrigues, Torres & Pontes, 2008). Plantas, fungos e algas são fontes potenciais de compostos dotados de propriedades imunostimulantes para uso na aquicultura de espécies aquáticas de interesse comercial (Jeney, Galeotti, Volpatti, Jeney & Anderson, 1997; Itami et al., 1998; Sakai, 1999; Campa-Córdova, Hernandez-Saavedra, Philipps & Ascendio, 2002; Dügenci & Candan, 2003; Chotieat, Tongsupa, Supamataya & Phongdara, 2004; Farias et al., 2004; Bagni et al., 2005; Bricknell & Dalmo, 2005; Supamattaya, Khunrag, Thanardkit & Verduyn, 2005; Montero-Rocha, A., McIntosh, Sánchez-Merino & Flores, 2006; Barroso, Rodrigues, Torres, Sampaio & Farias, 2007; Araújo, Farias, Rodrigues, Torres & Pontes, 2008).

Os polissacarídeos sulfatados (PSs) são macromoléculas polianiônicas estruturalmente complexas e heterogêneas encontradas em grandes concentrações nas matrizes extracelulares das algas marinhas nas quais desempenham papéis fisiológicos inerentes à vida desses organismos no ambiente marinho (Percival & MacDowell, 1967; Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b). Esses polímeros possuem uma versatilidade de aplicações biotecnológicas geradoras de interesses econômicos e científicos devido às suas propriedades reológicas e bioatividades (Glicksman, 1983; Araújo, Farias, Rodrigues, Torres & Pontes, 2008; Prajapati, Maheriya, Jani & Solanki, 2014; Mourão, 2015).

Há ainda poucos estudos sobre o emprego dos PSs de macroalgas marinhas bentônicas ocorrentes na costa brasileira como agentes profiláticos contra o estresse em camarões. Por exemplo, Barroso, Rodrigues, Torres, Sampaio & Farias (2007) relataram que a administração dos PSs extraídos da rodofícea *Botryocladia occidentalis* promove uma melhoria na taxa de sobrevivência de pós-larvas de *L. vannamei*. Mais recentemente, Rodrigues, Sousa-Júnior, Lourenço, Lima & Farias (2009a) observaram que, durante a administração de PSs da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia* na água de cultivo, resulta na melhoria da sobrevivência, atividade motora e consumo alimentar de juvenis de *L. vannamei*. Espécies algáceas vermelhas do gênero *Halymenia* C. Agardh (1817) são também conhecidas por apresentarem PSs com ações moduladoras sobre os sistemas de coagulação (Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b) e gastrointestinal (Graça et al., 2011).

Neste contexto, a presente investigação avaliou a resposta de camarões adultos tratados com PSs de *H. pseudofloresia*, quando cultivados em água doce em laboratório. A exposição dos animais a uma situação desfavorável de cultivo foi também aplicada ao final do experimento, a fim de compreender melhor as características físico-químicas desses compostos após obtidos do tecido muscular dos camarões sobreviventes ao desafio de estresse.

Material e Métodos

ALGA MARINHA E OBTENÇÃO DOS PSS

Os exemplares arribados da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia* (registrada sob n° 0623 no herbário ficológico do Laboratório de Ciências do Mar - Labomar, Universidade Federal do Ceará) foram coletados manualmente nas margens da praia de Flecheiras, município de Trairi, Ceará. No Laboratório de Bioquímica Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, as amostras da referida espécie foram lavadas com água destilada para a retirada de sal e areia e desidratadas em estufa (24 h; 40°C) como previamente descrito (Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b). Após esses procedimentos, o tecido foi cortado em pequenos pedaços e armazenado em frasco fechado, para posterior extração dos PSS totais.

Essencialmente cinco gramas de tecido desidratado foram digeridas (60°C; 24 h) com papaína, em 250 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo cisteína e EDTA (ambos 5 mM), de acordo com Farias, Valente, Pereira & Mourão (2000). Brevemente, o material foi centrifugado ($7.965 \times g$; 20 min. 10 °C), concentrado por precipitação com 16 mL de cloreto cetilpiridínio (CCP) a 10%, lavado (200 mL; CCP 0,05%; 25 °C; 24 h) e, posteriormente, dissolvido em 174 mL de NaCl 2 M: etanol absoluto (100: 15; v/v; 4 °C; 24 h). Logo após uma precipitação em etanol absoluto, o material foi lavado com etanol 80% (200 mL; 2 \times), etanol absoluto (200 mL; 1 \times) e seco em estufa (60 °C; 24 h). Os resíduos obtidos foram redigeridos com papaína para otimização do rendimento a partir de extrações consecutivas (Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b).

Cada extração foi realizada em triplicada e os valores obtidos submetidos à análise de variância (Anova), seguido pelo teste tukey ($p < 0,05$).

CAMARÕES E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Camarões adultos (8 g) *L. vannamei* foram obtidos de uma fazenda de cultivo comercial em água doce localizada no município de Jaguaruana, Estado do Ceará. Os animais foram transportados até o Laboratório de Aqüicultura do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, em sacos plásticos (20 L/40 animais) abastecidos com 1/3 de água doce do viveiro e 2/3 de oxigênio, os quais foram acondicionados em caixas de papelão forradas com isopor. No laboratório, os camarões foram aclimatizados por 30 min em uma caixa d'água de 500 L e, em seguida, estocados em aquários com volume de 38 L, na densidade de 0,3 camarões L⁻¹, permanecendo sob observação durante uma semana para que os camarões se recuperassem do estresse causado pelo transporte. Durante este período, foram realizadas duas trocas parciais diárias de água (25%) (8 e 15 h), de cada aquário, quando também foram retirados restos de ração e dejetos dos animais. A alimentação foi oferecida *ad libitum*, em duas porções diárias (9 e 16 h), com ração peletizada (35% PB). Manejo semelhante foi adotado durante o período experimental.

O experimento constou de dois tratamentos com três repetições cada um, sendo um ~~como~~ controle (sem a adição de PSS) e outro com a adição de PSS (1,0 mg L⁻¹), administrada duas vezes ao dia (10 e 17 h), sempre após a renovação de água. Para isso, os PSS foram dissolvidos em um pequeno volume de água destilada e, em seguida, adicionada na água de cada aquário, de acordo com descrito por Rodrigues, Sousa-Júnior, Lourenço, Lima & Farias (2009a).

SOBREVIVÊNCIA E GANHO DE PESO

A sobrevivência foi registrada diariamente, durante todo o período de cultivo dos animais. A avaliação do ganho de peso final (kg) foi estimada a partir de pesagens realizadas com balança semi-analítica (0,01 g).

TESTE DE ESTRESSE

Após 15 dias de cultivo, os camarões foram submetidos a uma situação de estresse, pela suspensão dos PSS e renovação de água dos aquários. A sobrevivência final também foi registrada e a condição de saúde dos animais avaliada (Rodrigues, Sousa-Júnior, Lourenço, Lima & Farias, 2009a).

VARIÁVEIS FÍSICO-QUÍMICAS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A temperatura (°C) e a concentração de oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) da água foram monitorados duas vezes por semana (Oxímetro). O pH também foi determinado com auxílio de um medidor de bancada bem como a concentração de amônia total (mg L⁻¹), a qual foi determinada através do método Nessler em espectrofotômetro através da leitura no comprimento de onda ajustado em 425 nm. Os dados de mortalidade e biomassa final foram submetidos ao teste *t*-Student (amostras independentes), com significância de 5%.

EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DO MÚSCULO E ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A extração dos PSs dos camarões que receberam o composto (T2) e aqueles de um grupo controle (T1) foram submetidos a uma extração de PSs a partir de três indivíduos, previamente descabeçados e descascados. Para isso, a parte muscular foi lavada com água destilada e levada para secagem em estufa (40 °C; 24 h), seguido da extração dos PSs a partir de 1,2 g de tecido seco, o qual foi cortado para digestão com 10% de papaína bruta, em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5mM, seguindo o mesmo protocolo de obtenção de PSs utilizado para a alga marinha deste trabalho.

Os extratos totais (alga × camarões) secos foram fracionados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose (6,5 × 1 cm) equilibrada e percolada com o mesmo tampão de extração. Os PSs adsorvidos no gel foram eluídos com tampão de extração contendo NaCl em diferentes concentrações (0,25 – 2,0 M), sendo monitorados através da propriedade metacromática usando o 1,9-azul dimetilmetileno de acordo com Fandarle, Buttle & Barrett (1986) em espectrofotômetro (525 nm), a partir de frações de 5 mL obtidas de um coletor de frações. As frações liofilizadas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,5% em tampão 1,3-acetato diaminopropano 0,05 M (pH 5,0), sendo a corrida realizada com voltagem 110 V durante 1 h. Após a corrida, os PSs presentes no gel (alga × camarões) foram fixados com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio 0,1% por 24 h. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina a 0,1% e descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético glacial (4,95: 4,95: 0,1; v/v/v) (Diethich & Dietrich, 1976).

Resultados e Discussão

CONTEÚDO DE PSS SUGERE VARIAR COM A COLETA DA ALGA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO

O emprego da digestão enzimática de proteínas por enzimas proteolíticas (papaína) na extração dos PSs totais presentes na alga marinha vermelha *H. pseudofloresia* resultou em três extrações consecutivas (Figura 1).

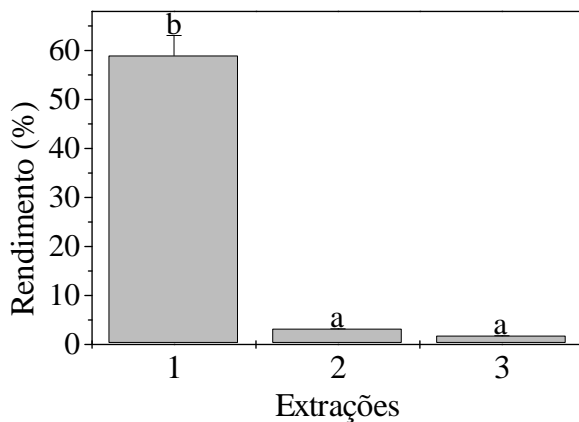


Figura 1. Rendimento, por extração, dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. Anova seguida pelo teste Tukey com $p < 0,05$ ($n = 3$).

A maior quantidade foi obtida durante a 1ª extração ($p < 0,05$), enquanto rendimentos bem inferiores foram obtidos na 2ª e 3ª extrações, totalizando assim 63,94% a partir da matéria-prima desidratada e secagem em estufa. Esse rendimento corroborou os resultados de Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias (2009b), para essa mesma espécie algácea, embora tenha obtido um rendimento de aproximadamente 1.36 vezes menor do que o deste estudo. Tal fato pode ser o resultado do uso de exemplares da alga em diferentes estágios de desenvolvimento, refletindo no rendimento de PSs totais (Percival & McDowell, 1967; Prajapati, Maheriya, Jani & Solanki, 2014).

A análise de rendimento do presente estudo superou àquela obtida para *Botryocladia occidentalis* (4%) (Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000), quando os polissacarídeos dessa espécie foram utilizados em bioensaios com peixes (Farias et al., 2004) e camarões (Barroso, Rodrigues, Torres, Sampaio & Farias, 2007). Lima (2007) observou que o rendimento de PSs totais da alga marinha parda *Spatoglossum shroederi* decresceu ao longo de três extrações consecutivas (29; 7,83 e 1,55%, respectivamente), antes de serem utilizados na água de cultivo durante o desenvolvimento de camarões *L. vannamei*. Os estudos implicam que

o uso de diferentes espécies de macroalgas e a coleta em diferentes períodos do ano pode ocasionar variação na quantidade de PSs obtida da matriz extracelular desses organismos (Percival & McDowell, 1967). A bioprospecção de fontes produtoras de ficocolóides é justificada devido às propriedades espessantes e geleificantes desses compostos (Glicksman, 1983; Prajapati, Maheriya, Jani & Solanki, 2014), bem como bioatividades (Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000; Chotieat, Tongsupa, Supamataya & Phongdara, 2004; Barroso, Rodrigues, Torres, Sampaio & Farias, 2007; Mourão, 2015).

A realização de bioensaios em laboratório tem sido ferramentas importantes na descoberta de fontes de imunostimulantes para aqüicultura, bem como no desenvolvimento de estratégias profiláticas mediante a avaliação e monitoramento do estado imunológico de camarões submetidos a cultivos, sob condição de estresse (Bachere, 2000). Neste contexto, o emprego de PSs extraídos de macroalgas nativas do litoral cearense no cultivo intensivo de peixes e camarões (Farias et al., 2004; Chotieat, Tongsupa, Supamataya & Phongdara, 2004; Lima, 2007; Araújo, Farias, Rodrigues, Torres & Pontes, 2008; Rodrigues, Júnior, Lourenço, Lima & Farias, 2009a), com exposições dos animais a diferentes níveis de estresse, têm sido parâmetros de resposta na seleção de espécies algais para o direcionamento de pesquisas a cerca dos efeitos dos PSs na resistência de camarões, tendo em vista a escassez de informações sobre o sistema imunológico desses animais e dos fatores que determinam as suas condições de saúde (Barraco, 2004). Portanto, a extração de maior rendimento PSs de *H. pseudofloresia* (Figura 1) foi utilizada no experimento *in vivo*.

MORTALIDADE

Durante as duas primeiras semanas que antecederam ao estresse, não foi observada melhoria na taxa de sobrevivência ($p > 0,05$) dos camarões que receberam as soluções de PSs (1 mg L^{-1}) em comparação ao tratamento controle (sem PSs) (Figura 2). No entanto, quando submetidos ao estresse desafiados ao estresse (terceira semana), a mortalidade dos animais reduziu ($p < 0,05$) após o tratamento com PSs, enquanto 100% de mortalidade dos camarões participantes do controle foram observadas ao final do experimento.

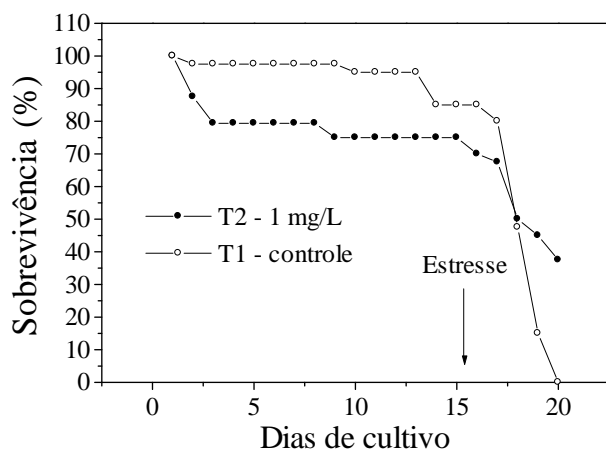


Figura 2. Mortalidade diária dos camarões adultos (*Litopenaeus vannamei*) durante o período de cultivo. Os PSs foram administrados durante os 15 primeiros dias, seguido de estresse dos animais (5 dias).

O uso de micro-organismos patogênicos, bem com a exposição a fatores de natureza química, biológica e/ou física também têm sido empregados para ativar o sistema imunológico dos organismos aquáticos. Por exemplo, na administração de doses diferentes de glucanos na dieta de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) para avaliar sua eficácia na ativação do sistema imunológico não específico submetidas a transporte por duas horas, Jeney, Galeotti, Volpatti, Jeney & Anderson (1997) observaram uma diminuição das defesas dos animais. No entanto, quando alimentados com baixas doses (0,1; 0,5 e 1%) algumas semanas antes do transporte, os animais responderam ao estresse. Campa-Córdova, Hernandez-Saavedra, Philipps & Ascendio, 2002, administrando por imersão soluções contendo β -glucano ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e PS ($1,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) da microalga *Cyanothece* sp em camarões adultos *L. vannamei* pesando 10 a 12 g, observaram um efeito imunostimulante 500 vezes superior do PS, com elevados níveis de atividade de enzima superóxido dismutase e geração do ânion superóxido. A administração oral dos PSs extraídos da alga marinha parda *Sargassum polycystum* no camarão *Penaeus monodon* preveniram o impacto do vírus causador síndrome da mancha branca (WSSV) nos animais (Chotieat, Tongsupa, Supamataya & Phongdara, 2004).

A incorporação de ácido algínico (ergosan) e o β -glucano na dieta do peixe *Diecentrarchus labrax*, habilitaram o sistema inune não-específico, quando os animais foram expostos principalmente a condições

ambientais adversas (Bagni et al., 2005). Na administração oral dos PSs extraídos da rodofícea *Gracilaria caudata* incorporados na ração de reversão de tilápias (*Oreochromis niloticus*), durante a reversão sexual dos peixes, Araújo, Farias, Rodrigues, Torres & Pontes (2008) observaram que pequenas doses do composto (0,1 e 0,2 mg g⁻¹) foram capazes de melhorar a sobrevivência, após a indução de uma situação extrema de estresse no cultivo.

Neste trabalho, a sobrevivência dos camarões tratados com PSs extraídos de *H. pseudofloresia* foi de 37,5% (Figura 2), semelhante àquela observada em pós-larvas de *L. vannamei* (36,1%) durante tratamento de imersões em intervalos de 24 h usando os PSs extraídos da rodofícea *B. occidentalis* (Barroso, Rodrigues, Torres, Sampaio & Farias, 2007). Segundo Itami et al. (1998), a administração oral com peptídeos glucanos (65 dias) resultou em uma melhoria na sobrevivência do camarão *Penaeus japonicus* (63,4%) submetido a infecção com *Vibrio penaeicida*, comparado ao controle (25%). Quando o período de administração foi prolongado para 95 dias, as sobrevivências atingiram 81,7 e 20%, respectivamente. Os imunostimulantes se traduzem como as melhores ferramentas na indução do crescimento e/ou sobrevivência (Sakai, 1999).

BIOMASSA FINAL VIVA E ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os camarões do tratamento sem PSs não apresentaram ganho de biomassa final viva ao final do período experimental, enquanto aqueles que receberam diariamente as soluções com PSs (1 mg L⁻¹), resistindo ao estresse (Figura 2) ($p < 0,05$), apresentaram $0,0542 \pm 0,0102$ kg de ganho de biomassa final. A maior atividade natatória e frequência de mudas, bem como no consumo alimentar sugerem que os animais estavam estimulados a crescer. Graça et al. (2011) relataram efeitos estimulatórios sobre o sistema gastrointestinal de roedores tratados com PSs extraídos da alga marinha vermelha *Halymenia floresia*. Os resultados desta pesquisa corroboram as observações de Lima (2007) que aplicaram diariamente na água de cultivo de *L. vannamei*, PSs (2 mg L⁻¹) extraídos da feofícea *S. shroederi*. Ademais, Rodrigues, Sousa-Júnior, Lourenço, Lima & Farias (2009a) verificaram a ocorrência de maior padronização no ganho de peso de camarões juvenis da mesma espécie, após 45 dias de cultivo seguido de estresse, quando previamente tratados com 1 mg L⁻¹ de PSs (*H. pseudofloresia*). Segundo Bricknell & Dalmo (2005), o emprego de imunostimulantes na aqüicultura deve envolver administrações em intervalos de 4 a 6 semanas, de maneira regular a resposta imune do animal. Os autores também propõem sua utilização em períodos críticos, quando os riscos de doenças são mais elevados (transporte, ciclo reprodutivo, etc).

O uso de β -glucano foi capaz de reduzir o estresse do *Penaeus japonicus* com o aumento da taxa de crescimento e a atividade fagocitária dos hemócitos dos camarões (Itami et al. 1998), enquanto que a incorporação de 10% da alga marinha parda *Macrocystis pyrifera* na dieta do *L. vannamei* resultou em aumento na taxa de crescimento dos animais através do incremento no consumo alimentar segundo Rivera et al. (2002). Os imunostimulantes são considerados as melhores ferramentas na indução do crescimento (Azad et al., 2005), na tentativa de minimizar os impactos da aqüicultura intensiva (peixes e camarões) e alcançar melhores produtividades (Sakai, 1999).

Este estudo revelou que os camarões responderam a administração diária de PSs (1 mg L⁻¹) (Figura 2) como reforçou também à obtenção dos PSs provenientes do músculo dos camarões, após 20 dias de cultivo. O procedimento de DEAE-celulose indicou perfis cromatográficos semelhantes entre os extratos contendo PSs da alga *H. pseudofloresia* e dos animais (Figura 3A) com base na metacromasia das frações eluídas de acordo com a concentração de sal (Fandarle, Buttle & Barrett, 1986), além da revelação por eletroforese de bandas polidispersas apresentando mobilidades similares entre as frações obtidas da cromatografia (Figura 3B) como esperado (Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b). Tais resultados combinados determinaram a sugestão de que alguma forma ocorreu absorção dos PSs da alga pelos camarões submetidos ao tratamento profilático. Em adição, a redução da propriedade metacromática de duas frações (F1 e F3) e a ausência da fração F5, no fracionamento dos PSs extraídos dos camarões, apontam que o composto foi, possivelmente, degradado pelos animais, somando-se também a um maior grau de resolução observado para a fração F2c, eluída com 0,75 M de sal, a partir do perfil eletroforético, quando comparada a F2a, obtida na mesma concentração de sal, durante o fracionamento desses compostos.

López et al. (2003) relataram que ao final de 40 dias de administração do β -glucano na dieta de juvenis do camarão *L. vannamei*, ocorreu degradação do polissacarídeo na glândula digestiva por β -glucanases para produzir energia, permitindo o direcionamento de outras proteínas para o crescimento, além de promover um aumento significativo do número de hemócitos nos animais.

No caso de PSs, não existem relatos da absorção ou degradação de PSs de algas marinhas por camarões e, caso isto tenha acontecido neste experimento, às quantidades absorvidas provavelmente não foram suficientes, possivelmente, para servir como fonte de energia. No entanto, a sobrevivência foi bastante evidente, indicando uma resposta de ação imunostimulante (Figura 2); portanto, sem apresentar sinais de

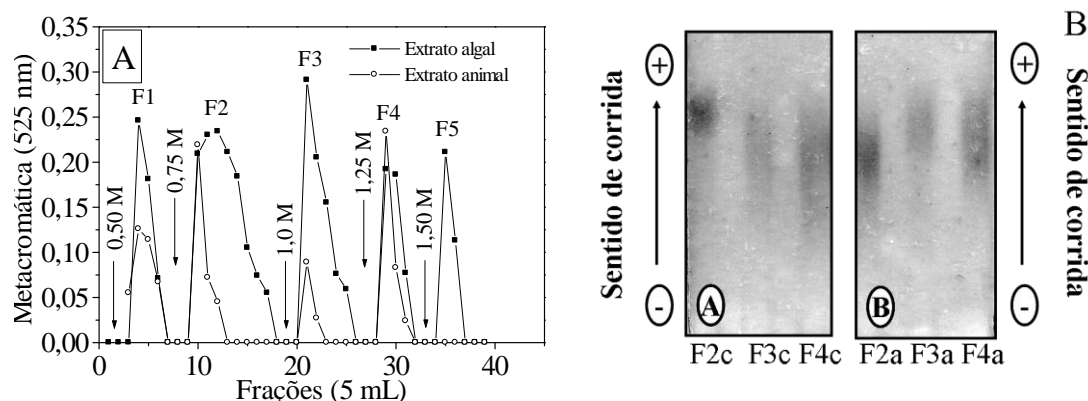


Figura 3. Cromatografia dos PSs em coluna de troca iônica DEAE-celulose (A) e análise das frações por eletroforese em gel de agarose (B). A, a coluna equilibrada e lavada com tampão AcNa. Os PSs adsorvidos no gel eluídos com NaCl em diferentes concentrações (0,50-1,50 M) e monitorados por metacromasia usando o azul 1,9-dimetilmetileno. (■—■) extrato algal; (○—○) extrato animal. B, eletroforese em gel de agarose das frações dos camarões (F2c; F3c e F4c - (A)) e *Halymenia pseudofloresia* (F2a; F3a e F4a - (B)) e coradas com azul de toluidina a 0,1%.

toxicidade importante em que comprometessem às atividades fisiológicas comuns dos animais (mobilidade, troca de mudas e consumo de alimento). A utilização de doses adequadas de imunostimulantes habilita a resposta imunológica não-específica dos animais. Quando tratados com dosagens elevadas, formação inadequada da pré-muda e riscos de toxidade podem ser observados em crustáceos, principalmente quando aplicados em longo prazo (Hauton & Smith, 2004).

A análise comparativa dos PSs (alga × camarões) foi somente realizada devido ao acúmulo do composto no músculo dos animais em razão, possivelmente, da sua viscosidade comumente apresentada pelos PSs de algas marinhas vermelhas (Glicksman, 1983; Prajapati, Maheriya, Jani & Solanki, 2014), quando dissolvidos no pequeno volume de água para o tratamento específico ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$). A detecção bioquímica desses polissacarídeos a partir do músculo (*L. vannamei*) possa assim vir a traduzir como uma ferramenta de apoio na avaliação de alguns parâmetros imunológicos em camarões, quando tratados com PSs. Segundo Campa-Córdova, Hernandez-Saavedra, Philipps & Ascendio (2002), banhos de imersão em camarões *L. vannamei* com polissacarídeos resultaram em melhoria de alguns parâmetros imunológicos, tais como a atividade da enzima superóxido dismutase e a geração do ânion superóxido, quando seus efeitos foram mensurados a partir dos hemócitos e do músculo dos animais, após períodos de 1, 3 e 6 horas de tratamentos. Os autores afirmaram ainda um efeito prolongado na atividade oxidativa da enzima 24 e 48 horas depois de 6 horas de imersão dos camarões com β -glucano, retornando aos valores normais após 72 h.

QUALIDADE DE ÁGUA

As variáveis físico-químicas da água, como temperatura variaram de 26,30 a 27,2 °C, pH de 6,86 a 7,23 e a concentração de oxigênio dissolvido de 4,37 a 6,30 mg L^{-1} , os quais mantiveram-se dentro dos limites para o cultivo da espécie em ambiente de laboratório (Rodrigues, Júnior, Lourenço, Lima & Farias, 2009a). Entretanto, os teores de amônia sofreram grandes variações no experimento, diferindo significativamente ($p < 0,05$) entre os períodos de administração dos PSs e a indução de estresse nos animais (Figura 4).

No entanto, a diferença na concentração de amônia encontrada na água de cultivo dos animais não se traduziu em um aumento da mortalidade dos camarões, uma vez que tal concentração decresceu acentuadamente durante o estresse, em virtude da diminuição da biomassa estocada (mortalidade) o que levou a reduzir o aporte de dejetos e ração na água doce de cultivo dos animais para a produção de compostos amoníacos (Esteves, 1988). Rodrigues, Sousa-Júnior, Lourenço, Lima & Farias (2009a) observaram, na indução de estresse em juvenis de *L. vannamei* (4 dias), previamente tratados com PSs (*H. pseudofloresia*) na água doce de cultivo (41 dias), uma exposição dos camarões a valores de turbidez mais elevados quando comparados ao grupo controle, sugerindo que esses compostos poderiam estar ajudando a minimizar o estresse osmótico dos animais, quando cultivados em água doce e sob condições adversas. No entanto, as administrações (1 mg L^{-1}), a cada 48 horas, na água de cultivo dos animais, não resultaram no aumento da

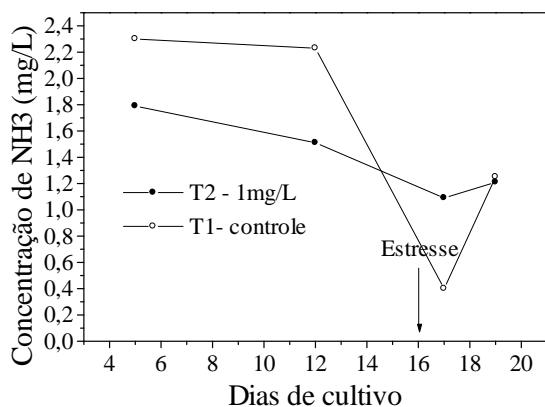


Figura 4. Variação da concentração de amônia durante o período de cultivo dos animais.

sobrevivência. A partir desse estudo prévio em juvenis, foi especulado para esta investigação que a frequência de aplicação na água doce de cultivo de PSs (*H. pseudofloresia*) poderia ser um requerimento importante na prevenção da mortalidade do camarão *L. vannamei* cultivado no estágio adulto.

Diante da realização deste estudo, o emprego de PSs da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* poderia habilitar a resposta imunológica de camarões frente a situações de estresse, apontando como uma ferramenta promissora ao desenvolvimento de estratégias profiláticas mais eficazes. Além de promover a saúde desses animais na fase adulta, especialmente quando cultivados em águas de baixa salinidade, nas quais ocasionam elevadas taxas de mortalidade quando os animais alcançam estágios adulto e sub-adulto (Valença & Mendes, 2004). Assim, camarões adultos de *L. vannamei* responderam de forma significativa às administrações diárias dos polianiônicos na água doce de cultivo, melhorando a sobrevivência, quando desafiados ao estresse.

Conclusões

A administração diária de pequenas quantidades dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* na água doce de cultivo de camarões adultos (*Litopenaeus vannamei*) é capaz de melhorar a taxa de sobrevivência dos animais, após a indução de uma situação de estresse no cultivo.

Referências

- Alday-Sanz, V. (2007). Why shrimp cannot be vaccinated? *Glob. Aquacult. Adv.*, 10(1): 84, 2007.
- Araújo, G. S. A., Farias, W. R. L., Rodrigues, J. A. G., Torres, V. M. & Pontes, G. C. (2008). Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodofíceia *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia. *Rev. Ciên. Agron.*, 39(4), 548-554.
- Azad, I. S., Panigrahi, A., Gopal, C., Paulpandi, S., Mahima, C. & Ravichandran, P. (2005). Routes of immunostimulation vis-a-vis survival and growth of *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquacult.*, 248(1-4): 227-234.
- Bachere, E. Shrimp immunity and disease control. *Aquacult.*, 91(1-3): 1-2.
- Bagni, M., Romano, N., Finioia, M. G., Abelli, L., Scarpigliati, G., Tiscar, P. G., Sarti, M. & Marino, G. (2005). Short- and long-term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fis. & Shellf. Immunol.*, 18(4): 311-325.
- Barraco, M. A. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. In: M.J.T. Ranzani-Paiva (Ed.). *Sanidade de organismos aquáticos* (pp. 51-74). São Paulo: Varela.
- Barroso, F. E. C., Rodrigues, J. A. G., Torres, V. M. T., Sampaio, A. H. & Farias, W. R. L. (2007). Efeito do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* nas pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*. *Rev. Ciên. Agron.*, 38(1): 58-63.

- Bricknell, I. & Dalmo, R. A. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fis. & Shellf. Immunol.*, 19(5): 457-472.
- Campa-Córdova, A. I., Hernandez-Saavedra, N. Y., Philipps, R. & Ascendio, F. (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulfated polysaccharide. *Fis. & Shellf. Immunol.*, 12(4): 353-366.
- Chotieat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K. & Phongdara, A. (2004). Effect of fuicodam on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquacult.*, 233(1-4): 23-30.
- Dietrich, C. P. & Dietrich, S. M. C. (1976). Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal. Biochem.*, 70(2): 645-647.
- Düğenci, S. K. & Candan, N. A. A. (2003). Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Jour. Ethopharm.*, 88(1): 99-106.
- Esteves, F.A. (1988). *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro: Interciência.
- Farndale, R. W., Buttle, D. J. & BARRETT, A. J. (1986). Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta*, 883(2): 173-177.
- Farias, W. R. L., Valente, A. P., Pereira, M. S. & Mourão, P. A. S. (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 from invertebrates. *Jour. Biol. Chem.*, 275(38): 29299-29307.
- Farias, W. R. L., Rebouças, H. J., Torres, V. M., Rodrigues, J. A. G., Pontes, G. C., Silva, F. H. O. & Sampaio, A. H. (2004). Enhancement of growth in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from marine algae. *Rev. Ciên. Agron.*, 35(número especial): 189-195.
- Figueiredo, H. C. P., Godoy, D. T. & Leal, C. A. G. (2008). Sanidade aquícola: antibióticos na aquíicultura. *Rev. Panor. Aqüicult.*, 16(105): 42-49.
- Gesteira, T. C. V. (2006). Enfermidades infecciosas registradas na carcinicultura brasileira. In: A. T. Silva-Souza, *Sanidade de organismos aquáticos no Brasil* (pp.137-158.2). Maringá: Abrapoa.
- Glicksman, M. (1983). *Food hydrocolloids. Natural plant exudates – seaweed extracts*. Baton Raton: CRC Press.
- Graça, J. R. V., Bezerra, M. M., Lima, V., Rodrigues, J. A. G., Monteiro, D. L. S., Quinderé, A. L. G., Amorim, R. C. N., Paula, R. C. M. & Benevides, N. M. B. (2011). Effect of a crude sulfated polysaccharide from *Halymenia floresia* (Rhodophyta) on gastrointestinal smooth muscle contractility. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 54(5): 907-916.
- Hauton, C. & smith, V. J. (2004). *In vitro* cytotoxicity of crustacean immunostimulants for lobster (*Homarus gammarus*) granulocytes demonstrated using the neutral red uptake assay. *Fis. Shellf. Immunol.*, 17(1): 65-73.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M. & Takahashi, Y. (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptodoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquacult.*, 164(1-4), 277-288.
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z. & Anderson, D. P. (1997). Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquacult.*, 154(1): 1-15.
- Lima, P. C. W. C. (2007). *Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum shroederi* sobre o aumento da resistência do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* submetido a situações de estresse* [Dissertação Mestrado]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.
- López, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboa, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sánchez, A. & Rosas, C. (2003). Physiological, nutritional and immunological role of dietary beta-1,3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquacult.*, 224(1-4): 223-243.

- Montero-Rocha, A., McIntosh, D., Sánchez-Merino, R. & Flores, L. (2006). Immunostimulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following dietary administration of Ergosan. *Jour. Invert. Pathol.*, 91(3): 188-194.
- Mourão, P. A. S. (2015). Perspective on the use of sulfated polysaccharides from marine organisms as a source of new antithrombotic drugs. *Mar. Drugs*, 1(5): 2770-2784.
- Percival, E. & McDowell, R. H. (1967). *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. New York: Academic press.
- Perez-Farfante, I. & Kensley, B. (1997). Families and genera of the Penaeoid and Sergestoid shrimps.
- Prajapati, V. D., Maheriya, P. M., Jani, G. K. & Solanki, H. K. (2014). Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*, 105(25): 97-112.
- Rivera, G., Yoong, F., Riofrio, G. B., Reinoso, B., Hurtado, F. & Massuh, P. (2002). Inclusión de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) em alimentos balanceados para camarón. *CIVA*, 244-252.
- Rocha, I.P. & Rodrigues, J. A. (2003). A carcinicultura brasileira em 2003. *Rev. ABCC.*, 6(1): 30-36.
- Rodrigues, J. A. G., Júnior, J. S., Lourenço, J. A., Lima, P. C. W. C. & Farias, W. R. L. (2009a). Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Halymenia pseudofloresia* mediante uma estratégia profilática. *Rev. Ciên. Agron.*, 40(1): 71-78.
- Rodrigues, J. A. G., Torres, V. M., Alencar, D. B., Sampaio, A. H. & Farias, W. R. L. (2009b). Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. *Rev. Ciên. Agron.*, 40(2): 224-231.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquacult.*, 172(1): 63-92.
- Supamattaya, K., Khunrag, P., Thanardkit, P. & Verduyn, C. (2005). Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquacult.*, 248(1-4): 207-216.
- Valença, A. R. & Mendes, G. N. (2004). Importância da composição iônica da água oligohalina e “doce” no cultivo de *Litopenaeus vannamei*. *Rev. Panor. Aquicult.*, 14(86): 23-29.
- Vadstein, O. (1997). The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquacult.*, 155(1-4), 401-417.