

AValiação DOS EFEITOS DA IMERSÃO DE PÓS-LARVAS DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*
EM ÁGUAS DE CULTIVO COM POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

EVALUATION OF EFFECTS OF THE IMMERSION OF SHRIMP POST-LARVAE *Litopenaeus vannamei*
IN WATERS OF CULTURE WITH SULFATED POLYSACCHARIDES

José Ariévil Gurgel RODRIGUES*; José de Sousa Junior JÚNIOR; Perla Lorena MOREIRA;
Diego Silva MELO; Jullyermes Araújo LOURENÇO; Paula Cristina Walger de Camargo LIMA;
Valeska Martins TORRES; Grazielle da Costa PONTES; Wladimir Ronald Lobo FARIAS

Departamento de Engenharia de Pesca, Laboratório de Aqüicultura, Universidade Federal do Ceará

*Email: arieviloengpesca@yahoo.com.br

Recebido em: 26 de outubro de 2007

Resumo - O desenvolvimento de estratégias profiláticas é essencial para o controle de doenças infecciosas e outros fatores de risco na aqüicultura. Muitos imunostimulantes têm sido estudados, no mundo, e os polissacarídeos sulfatados (PS) de algas marinhas em especial, pois podem minimizar o impacto do estresse nos cultivos intensivos de organismos aquáticos. Desta forma objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes doses de PS extraídos da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* em pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* submetidas a estresse. Os PS foram extraídos utilizando-se digestão enzimática, a partir de algas marinhas coletadas na Praia do Pacheco/CE. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos (0,0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) e três repetições. Diariamente, nos 12 dias iniciais foram aplicados os banhos de imersão nas pós-larvas e, posteriormente, submetidas durante seis dias à estresse com a suspensão da renovação de água do cultivo. As administrações foram realizadas após cada troca de água, sendo o monitoramento dos parâmetros físico-químicos intensificado durante o estresse. Verificou-se que as imersões das pós-larvas na água de cultivo com PS não surtiram efeitos no ganho de peso e na taxa de sobrevivência ($p > 0,05$). Por outro lado, o diagnóstico dos animais que receberam 0,1 mg L⁻¹ de PS atestou um melhor quadro aparente de saúde após a indução de uma situação adversa de estresse.

Palavras-chave: *Solieria filiformis*, polissacarídeos sulfatados, *Litopenaeus vannamei*, estresse.

Abstract - The development of prophylactic strategies is essential for the infectious disease control and other factors of risk in aquaculture. Several immunostimulants have been studied in the world and the sulfated polysaccharides (SP) from seaweeds can reduce the impact of stress in aquatic organism's intensive culture. The aim of this work was to evaluate the effect of the addition of different doses of SP extracted from the marine red alga *Solieria filiformis* in shrimp post-larvae (*Litopenaeus vannamei*) submitted to stress conditions. SP were extracted by the enzymatic digestion of marine alga collected in Praia do Pacheco, Ceará State. The experimental design was completely randomized to 4 treatments (0.0; 0.1; 0.5 and 1.0 mg L⁻¹) and three replications. Daily, the initial 12 days' period the baths of immersion in the post-larvae and then submitted for 6 days to stress with suspension of renewal of water of the culture. The administrations were done after each exchange of water, and the tracking of physico-chemical parameters intensified during stress. It was found that the immersions of post-larvae in the water for cultivation with PS had no effect on weight gain and survival rate ($p > 0.05$). On the another hand, the animals that received 0.1 mg L⁻¹ of PS demonstrated a better health state after being induced to an adverse stress situation.

Key words - *Solieria filiformis*, sulfated polysaccharides, *Litopenaeus vannamei*, stress.

INTRODUÇÃO

O mercado internacional do camarão é regido pelo cultivo de duas espécies, *Penaeus monodon* e *Litopenaeus vannamei*, as quais correspondem a 70% do volume ofertado. No Brasil, o cultivo intensivo de *L. vannamei* também demonstrou viabilidade comercial, principalmente, no Nordeste brasileiro (BRASIL, 2001), tornando o País uma referência no Hemisfério Sul (Rocha & Rodrigues, 2004).

A aquicultura intensiva em muitos países vem provocando modificações na estrutura da fauna e flora dos ecossistemas costeiros (Phillips, Lin & Beveridge, 1993), além de favorecer o surgimento de doenças infecciosas nos cultivos (Vadstein, 1997), o que frequentemente recorre-se a estratégias de controle microbiano, tais como o uso de antibióticos, desinfecção e vacinas contra doenças específicas. Por outro lado, o uso de antibióticos coloca em risco o equilíbrio ambiental e a qualidade do produto ao consumidor (Cook, Hayball, Hutchinson, Nowak & Hayball, 2003).

A busca por novas ferramentas sustentáveis para o cultivo do camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, é extremamente importantes para rejuvenescer o setor desgastado por crises econômicas decorrentes do surgimento de enfermidades, as quais fragilizam a atividade no mundo. Vários compostos imunostimulantes têm sido amplamente estudados, os quais promovem a ativação das células de defesas do sistema inato contra doenças infecciosas (Sakai, Kamiya, Ishii, Atsuta & Kobayashi, 1992; Azad et al., 2005), melhorando o estado de saúde dos animais durante eventos que promovam estresse (Bricknell & Dalmo, 2005). Diversos compostos derivados de animais, plantas, fungos, algas (micro e macroalgas) etc., têm sido avaliados quanto aos seus efeitos imunostimulantes em organismos aquáticos em diversas fases de desenvolvimento (Bricknell & Dalmo, 2005; Montero-Rocha, McIntosh, Sánchez-Merino & Flores, 2006; Citarasu, Sivaram, Immanuel, Rout, & Murugan, 2006). Dentre eles, os polissacarídeos sulfatados (PS) extraídos de algas marinhas apresentam propriedades imunostimulantes em peixes e camarões (Farias et al., 2004; Fu, Hou, Yeh, Li & Chen, 2007). Além do efeito imunostimulante, os PS de algas marinhas também são conhecidos por possuir outras atividades biológicas, tais como antiviral, anticoagulante e antitrombótica (Hayashi, Hayashi & Kojima, 1996; Farias, Nazareth & Mourão, 2001), o que também tem despertado grande interesse nas ciências médicas.

O primeiro relato de atividade imunostimulante oriunda de uma alga foi descrita por Campa-Córdova, Hernández-Saavedra, De Philippis & Ascencio (2002), reportando que a imersão de PS extraídos de uma microalga cianofíceia em juvenis do camarão branco *L. vannamei* proporcionou um aumento da capacidade oxidativa dos hemócitos nos animais. Costa et al. (2006)

observaram que as algas marinhas vermelhas *Botryocladia accidentalis* e *Solieria filiformis* preveniram o impacto do vírus da mancha branca no camarão *L. vannamei* quando os PS foram incorporados à ração. Quando esses PS de *B. accidentalis* foram imersos na água de cultivo de pós-larvas de *L. vannamei*, também foi observada uma redução significativa da mortalidade (Barroso, Rodrigues, Torres, Sampaio & Farias, 2007). Uma melhoria na taxa de sobrevivência também foi obtida quando os PS da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* foram administrados na água de cultivo de camarões adultos da mesma espécie (Rodrigues, 2006).

De forma a contribuir com o desenvolvimento de pesquisas chaves, para a sustentabilidade da carcinicultura marinha e direcionar esforços para o estabelecimento de estratégias de controle de doenças advindas da intensificação da atividade, pós-larvas de camarões marinhos *L. vannamei* foram induzidas a uma condição desfavorável de cultivo, gerada pela suspensão da renovação de água, com o objetivo de avaliar a resistência e o estado comportamental das pós-larvas mediante administração de diferentes doses de PS obtidos a partir da alga marinha vermelha *S. filiformis*.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA E EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA

A coleta da alga marinha vermelha *S. filiformis* (Solieriaceae, Rhodophyta) foi realizada na Praia do Pacheco-Ceará-Brasil, a qual foi conduzida ao Laboratório de Bioquímica Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará (DEP/UFC) para limpeza e estocagem a -20 °C. A extração dos PS iniciou-se a partir 2 g de alga seca e triturada com 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM. Em seguida, foram adicionados 7 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg mL⁻¹), sendo a mistura incubada em banho-maria (60 °C; 24 h). Após esse período, o material foi filtrado, centrifugado (8000 × g; 25 min.; 4 °C) e, ao sobrenadante, foram adicionados três volumes de etanol absoluto para precipitação dos PS presentes na mistura por 48 horas em freezer. Logo após a precipitação, o material foi novamente centrifugado e submetido a duas lavagens com 200 mL de etanol a 80% e uma com 150 mL de etanol absoluto. Após essa etapa, os PS foram secos em estufa (60 °C; 24 h) para obtenção do extrato bruto total, o qual foi obtido rendimento de 504 mg.

PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE IMERSÃO

Diferentes doses de PS foram preparadas a fim de se obter concentrações finais de 0,0 (controle); 0,1; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ na água de cultivo dos camarões. Inicialmente, os PS foram

dissolvidos em um pequeno volume de água destilada e, em seguida, as referidas soluções foram adicionadas (dose dia⁻¹), respectivamente, pela manhã, sempre após a renovação de água.

AQUISIÇÃO E ESTOCAGEM DAS PÓS-LARVAS EM LABORATÓRIO

Aproximadamente 1000 exemplares de pós-larvas com 40 dias (PL₄₀) de *L. vannamei*, aclimatadas em água doce e com peso médio inicial de $0,103 \pm 0,016$ g foram obtidas de uma fazenda de carcinicultura do Ceará. As pós-larvas foram aclimatadas por 30 minutos em uma caixa d'água de 500 L e, em seguida, estocadas aleatoriamente em aquários contendo 15 L de volume útil (5 PL L⁻¹). Após a estocagem, os animais permaneceram sob observação durante uma semana para que se recuperassem do estresse causado pelo transporte. Durante o período de aclimação, o experimento foi conduzido com renovação de 25% da água de cada aquário, por sifonamento, onde também foram retirados restos de ração e dejetos dos animais. O manejo alimentar ficou restrito a três refeições diárias, até a saciedade, utilizando ração com 40% de proteína bruta.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura (DEP/UFC) e seguiu um delineamento inteiramente casualizado constando de quatro tratamentos com três repetições cada, sendo o controle sem a adição do PS (T₁), e os três tratamentos contendo PS (T₂ - 0,1; T₃ - 0,5 e T₄ - 1,0 mg L⁻¹). Durante cada alimentação, o sistema de aeração foi desligado por 1 hora. O experimento teve duração de 18 dias, sendo 12 dias de administração dos PS e 6 de indução ao estresse. Durante esse período as trocas parciais de água foram suspensas. Semanalmente, o pH, a temperatura e o oxigênio dissolvido da água foram monitorados. Todavia, durante os seis dias de estresse, a frequência do monitoramento foi intensificada, sendo então realizada em dias alternados. Os dados de sobrevivência foram registrados pela diferença entre o antes e depois da indução do estresse dos animais, sendo submetidos à análise de variância ANOVA bifatorial. Já o ganho de peso foi analisado em ANOVA unifatorial, sendo adotado um nível de significância de 5% para ambos os testes.

RESULTADOS

SOBREVIVÊNCIA

Ao submeter pós-larvas do *L.vannamei* a administração dos PS na água de cultivo não foi observado diferença significativa ($p \geq 0,05$). Contudo, a menor sobrevivência observada foi no T₃, durante a fase de estresse, em decorrência de um descontrole do fornecimento de ar ao sistema em duas das repetições (Figura 1). No tratamento T₂, observou-se uma melhoria na taxa tanto durante a

administração dos PS como após o período de indução de estresse nos animais, mas não diferiu entre os tratamentos T₁ e T₄.

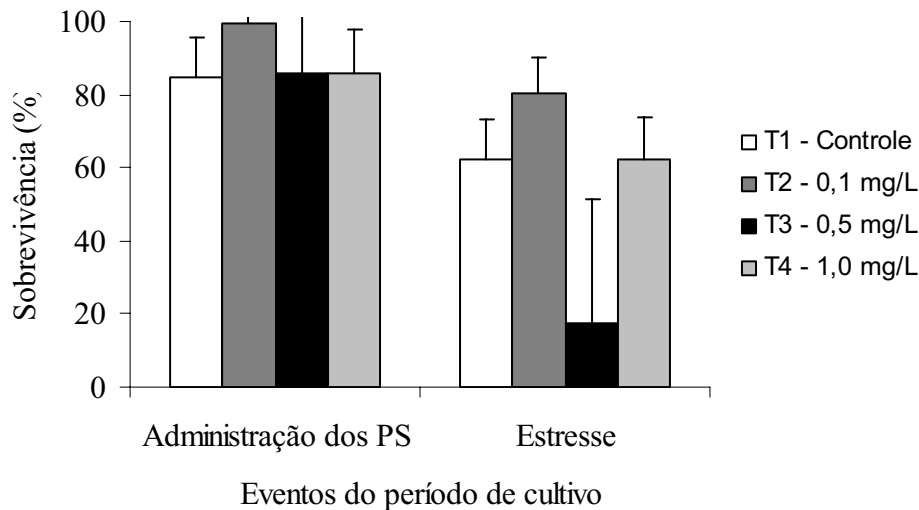


Figura 1 - Sobrevivência das pós-larvas de *Litopenaeus vannamei* quando submetidas às administrações de polissacarídeos sulfatados (PS).

BIOMASSA FINAL VIVA E GANHO DE PESO

O tratamento com 0,1 mg L⁻¹ de PS apresentou a maior biomassa final viva ao término do estresse induzido, mas não diferiu significativamente entre os tratamentos ($p \geq 0,05$). (Tabela 1). No tratamento T₃, sobreviveram poucos animais em apenas uma das repetições, contribuindo assim para os menores valores de biomassa final viva. Os pesos médios finais, por tratamento, foram 0,196 ± 0,002 (T₁); 0,191 ± 0,034 (T₂); 0,074 ± 0,126 (T₃) e 0,202 ± 0,044 g (T₄), respectivamente, os quais também não diferiram.

Tabela 1 - Biomassa final viva e ganho de peso das pós-larvas de *Litopenaeus vannamei*, por tratamento, ao final do experimento.

Tratamentos	Biomassa final (g)	GPP (g)
T ₁ - Controle	9,172 ± 1,435 ^a	0,093 ± 0,002 ^a
T ₂ - 0,1 mg L ⁻¹	11,437 ± 2,625 ^a	0,088 ± 0,036 ^a
T ₃ - 0,5 mg L ⁻¹	2,873 ± 4,976 ^a	rb
T ₄ - 1,0 mg L ⁻¹	8,883 ± 2,029 ^a	0,099 ± 0,044 ^a

Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre as médias.

GPP: ganho de peso do período; **rb:** redução de biomassa.

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Durante o experimento, a temperatura ficou em torno de $28,04 \pm 0,24$ °C (média \pm DP), o pH foi de $7,13 \pm 0,35$ e o oxigênio dissolvido atingiu valores de $3,25 \pm 0,50$ mg L⁻¹. Todas as variáveis mantiveram-se dentro dos valores recomendados para o cultivo do camarão marinho *L. vannamei*. Porém, o aumento da turbidez da água de cultivo, durante o estresse, ocasionou uma alteração significativa do comportamento dos animais.

DISCUSSÃO

Nos trabalhos envolvendo imunoestimulantes são relatados que os efeitos negativos do estresse em camarões e peixes em diversas fases de desenvolvimento podem ser minimizados mediante diferentes formas de administração. Itami et al. (1998) relataram que a administração oral do β -glucano (polissacarídeos não-sulfatado) aumentou a sobrevivência, a taxa de crescimento e a atividade fagocitária em camarões *Penaeus japonicus*. Banhos de imersão em camarões *L. vannamei* com PS extraídos de uma microalga cianofíceia resultaram na melhoria de alguns parâmetros imunológicos, tais como a atividade da enzima superóxido dismutase e a geração do ânion superóxido (Campa-Córdova, Hernández-Saavedra, De Philippis & Ascencio, 2002). (Rivera et al., 2002) relataram que o incremento de 10% do extrato da alga marinha parda *Macrocystis pyrifera* na dieta de camarões *L. vannamei* resultou em uma maior biomassa final. Segundo Fu, HouYeh, Li & Chen (2007) ao estudarem diferentes vias de administração (oral, imersão e injeção) de PS da alga marinha vermelha *Gelidium amansii* sendo observado um aumento da habilidade imune e resistência em camarões *L. vannamei* quando foram expostos a bactéria *Vibrio alginolyticus*. A utilização por via oral apresentou um melhor efeito após duas semanas de administração.

A administração dos PS de *S. filiformis*, neste trabalho, não surtiu efeitos significativos na taxa de sobrevivência e/ou no ganho de peso dos animais. Por outro lado, foi possível avaliar o estado de saúde dos camarões quando tratados com 0,1 mg L⁻¹ de PS, sendo observado uma maior atividade natatória e uma maior aptidão alimentar, mesmo quando submetidos ao estresse. O aumento da turbidez durante a suspensão da renovação da água de cultivo proporcionou uma maior rejeição do alimento ofertado aos animais dos tratamentos T₁ e T₃ durante o experimento, indicando um comportamento de estresse. Os animais do tratamento T₂ não demonstraram estímulos promovidos pelo estresse durante o experimento.

Alguns eventos têm sido relatados como efeitos adicionais a imunoestimulação. Rodrigues, (2006) observou que a administração diária de 1,0 mg L⁻¹ dos PS da alga marinha vermelha *H.*

pseudofloresia promoveu um comportamento mais ativo, aumento da frequência de mudas e maior apetite alimentar em camarões adultos de *L. vannamei*. Além disso, esses polissacarídeos reduziram significativamente a taxa de mortalidade quando os animais foram submetidos a condições adversas de estresse. Lopez et al (2003) ao estudarem β -glucanos na dieta de juvenis do camarão *L. vannamei* relatam que o polissacarídeo foi degradado na glândula digestiva por β -glucanases para produzir energia após 40 dias de administração, permitindo o direcionamento de outras proteínas para o crescimento. Entretanto, neste último caso, não existem relatos da ocorrência desses eventos com PS de algas marinhas.

Segundo Tavares-Dias & Moraes (2004) os autores relatam que a análise dos padrões sanguíneos são subsídios importantes no diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas em populações. Uma forma de avaliar o estado de saúde de peixes é o diagnóstico dos tecidos hematopoéticos pela presença de centros de melanomacrófagos ou agregados de macrófagos no fígado, baço e no rim. Esses centros possuem função imunológica como respostas humoral e inflamatória e ainda estocam, destroem, ou detoxificam substâncias exógenas e endógenas. Farias et al. (2004) observaram que pequenas doses de PS da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* aumentaram a taxa de sobrevivência durante a reversão sexual da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. Aumento da atividade fagocítica e a produção de ânion superóxido foram estimulados pela administração da microalga *Spirulina platensis* incorporada na dieta da carpa comum *Cyprinus carpio* (Watanuki, Ota, Malina, Tassakka, Kato & Sakai, 2006).

São reportadas em algumas pesquisas que o estabelecimento de uma dose ótima de um imunostimulante é extremamente importante para se obter uma resposta efetiva e alguns relatos (Boonyaratpalin, Boonyaratpalin, Supamattaya & Yoride, 1995; Park & Jeong, 1996; Tinman, Belotsky, Avidar, Bogin, E. & Bejerano, 2000; Farias et al., 2004) têm demonstrado que doses baixas surtem um melhor efeito do que doses mais elevadas. A utilização de doses mais elevadas pode causar imunossupressão em peixes (Sakai, 1999) e deformidades durante a pré-muda em crustáceos (Cenaim, 2001). Porém, essas avaliações podem ser estratégias para a descoberta de doses intermédias que direcionem administrações específicas durante eventos que promovam estresse, tais como no transporte e no ciclo reprodutivo dos animais aquáticos (Bricknell & Dalmo, 2005). Os imunostimulantes são considerados como as melhores ferramentas na indução do crescimento e sobrevivência em camarões (Azad et al., 2005), sendo a melhor alternativa durante o monitoramento de doenças infecciosas, ocasionadas pelo estresse, que agridem o sistema imune em camarões (Alday-Sanz, 2007).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que as diferentes doses de PS de *S. filiformis* utilizadas não promoveram melhoria no desempenho zootécnico do animal. Desta forma, recomenda-se a utilização desses compostos mediante outras diferentes vias de administração e com um período maior de aplicação em diferentes fases de desenvolvimento do *L. vannamei*. A complexidade e a heterogeneidade dos PS são justificadas em razão das diferentes possibilidades de ligações entre monossacarídeos e a distribuição de grupamentos sulfato. Desta forma, cada espécie de alga pode possuir conformação estrutural única e que resulta em diferentes requisitos para a ação biológica que são, na maioria dos casos, difíceis de elucidar (Percival & Macdowell, 1967; Mourão & Pereira, 1999; Farias et al., 2000). A utilização de diferentes estratégias de administração desses compostos (*S. filiformis*) no *L. vannamei* talvez habilite o sistema imune a promover resistência dos animais quando expostos as situações de estresse.

A aqüicultura integrada tem ganhado destaque nos últimos anos, mediante a associação de cultivos de algas e ostras, contribuindo de maneira significativa na melhoria da qualidade de água dos efluentes e reduzindo as chances de doenças nos cultivos de organismos aquáticos de interesse comercial (Neori et al., 1996; Calvacante-Júnior, Andrade, Bezerra, Gurjão & Farias, 2005). Além disso, a produção de algas na própria fazenda de camarão marinho poderia ser mais uma alternativa na suplementação na dieta dos animais, na forma de farinha de algas, contribuindo também com a redução dos custos de produção e o extrativismo a partir dos bancos naturais. O manejo adequado dos recursos naturais é de extrema importância para o equilíbrio ambiental e a sustentabilidade da atividade na geração de proteína animal para a população.

A realização de novos estudos com diferentes administrações dos PS da alga marinha vermelha *S. filiformis* são recomendados a fim de avaliar seus efeitos no estresse de pós-larvas do camarão marinho *L. vannamei*.

CONCLUSÃO

A adição diária dos polissacarídeos sulfatados, extraídos da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*, na água de cultivo de camarões *L. vannamei*, não resultou no aumento da taxa de sobrevivência e ganho de peso dos animais ($p > 0,05$). No entanto, a administração de pequenas quantidades do composto promoveu uma melhoria no quadro aparente de saúde dos animais quando expostos a uma situação adversa de estresse.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho contou com o apoio financeiro do MCT/PADCT/CNPq.

REFERÊNCIAS

- Alday-Sanz, V. (2007). *Why shrimp cannot be vaccinated?*. *Global Aquaculture Advocate*. 10(1): 84.
- 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. *Aquaculture*. 248(1): 227-234.
- Barroso, F.E.C., Rodrigues, J.A.G., Torres, V.M., 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. *Fish and Shellfish Immunology*. 19(5): 457-472.
- Boonyaratpalin, S., Boonyaratpalin, M., Supamattaya, K. & Yoride, Y. (1995). Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune responses, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. In: SHARIFF, M., SUBASIGHE, R.P., ARTHUR, J.R.. Diseases in Asian Aquaculture Vol. 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p. 469-477.
- Calvacante-Júnior, V., Andrade, L.N., Bezerra, L.N., Gurjão, L.M. & Farias, W.R.L. (2005). Reuso de água em um sistema integrado com peixes, sedimentação, ostras e macroalgas. *Rev. Bras. De Eng. Agri. Amb.* 9 (suplemento): 118-122.
- Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., De Philippis, R. & Ascencio, F. (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulfated polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*. 12 (4): 353-366.
- Cenaim Informa (2001). Boletín Informativo Quincenal, 15 de Noviembre de 2001 WSSV y temperatura, inmuestimulantes, vitaminas... Como se relaciona todo?. Acessado em 9 de novembro de 2006 em <http://www.cenaim.espol.edu.ec>.
- Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N. & Murugan, V. (2006). Influence of selected indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes, *Fish and Shellfish Immunology*, 21: 372-384.

- Cook, M.T., Hayball, P.J., Hutchinson, W., Nowak, B.F. & Hayball, J.D. (2003). 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 and Shellfish Immunology*. 14 (4): 333-345.
- Costa, F.H.F., Farias, W.R.L., Sampaio, A.H., Saker-Sampaio, S., Rocha, I.R.C.B., Pontes, G.C.; Silva, C.M., Silva-Neto, J.F., Silva, F.L.S., Nunes, E.V., Souza, A.L.F. & Lima-Júnior, T.B. (2006). 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*. Feira Nacional de Camarão. Suplemento 2005 : 25-32. Acessado em 24 de outubro de 2006 em <http://www.agriambi.com.br/Revista>.
- 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 (especial): 189-195.
- Farias, W.R.L., Nazareth, R.A. & Mourão, P.A.S. (2001). Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. *Thrombosis and Haemostasis*. 86 (6): 1540-1546.
- 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. *J. Biol. Chemis.* 275(38): 29299-29307.
- Fu, Y.W., Hou, W.Y., Yeh, S.T., Li, C.H. & Chen, J.C. (2007). The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 22 (6): 673-685.
- Hayashi, K., Hayashi, T. & Kojima, I. (1996). A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: *In vitro* and *ex vivo* evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 12 (15): 1463-1471.
- 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 peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*. 164 (1-4): 277-288.

- López, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, 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. *Aquaculture*. 224 (1-4): 223-243.
- Montero-Rocha, A., McIntosh, D., Sánchez-Merino, R. & Flores, (2006). Immunostimulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following dietary administration of Ergosan. *J. Invert. Pathol.* 91: 188-194.
- Mourão, P.A.S. & Pereira, M.S. (1999). Searching for alternatives to heparin: Sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends Cardiovascular Medicine*. 9(8): 225-232.
- Neori, A., Michael, D.K., Eller, S.P., Boyd, C.E., Popper, D., Rabinovitch, R., Davison, P.J., Dvir, O., Zuber, D., Ucko, M., Angel, D. & Gordin, H. (1996). Seaweed biofilters as regulators of water quality in integrad fish-seaweed culture units. *Aquaculture*. 141: 183-199.
- Park, H.H. & Jeong, H.D. (1996). Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharide. *Aquaculture*. 143 (2): 135-143.
- Percival, E. & Macdowell, R.H. (1967). *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. New York: Academic Press.
- Phillips, M.J., Lin, C.K. & Beveridge, M.C.M. (1993). Shrimp culture and the environment – lessons from the world’s most rapidly expanding warmwater aquaculture sector. In: ICLARM Conference, Manila, abstracts...Manila: 171-197.
- BRASIL. DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA (2001). Origem, fases e principais espécies cultivadas do camarão marinho. In: Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado. Brasília: MAPA/SARC/DPA.CNPq/ABCC: 23-28.
- Rivera, G., Yoong, F., Riofrio, G.B., Reinoso, B., Hurtado, F. & Massuh, P. (2002). Inclusion de harina de kelp (*Macrosystis pyrifera*) em alimentos balanceados para camarón. *I Congresso Iberoamericano Virtual de Aqüicultura* (pp.244-252). Acessado em 19 de maio de 2002 em <http://www.civa2003.org>.
- Rocha, I. P. & Rodrigues, J. (2004). A carcinicultura brasileira em 2003. *Rev. da ABCC*. 6 (1): 30-36.

- Rodrigues, J.A.G. (2006). *Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero Halymenia e seu efeito imunestimulante no camarão marinho Litopenaeus vannamei* [Dissertação de Mestrado]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 172 (1-2): 63-92.
- Sakai, M., Kamiya, H., Ishii, S., Atsuta, S. & Kobayashi, M. (1992). The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Diseases in Asian. *Aquaculture*. 1: 413–417.
- Tavares-Dias, M. & Moraes, F.R (Eds) (2004). *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: Marco Tavares–Dias.
- Tinman, S., Belotsky, S., Avidar, Y., Bogin, E. & Bejerano, I. (2000). Effect of long-term oral administration of peptidoglycan (PG - Ajinomoto product) on growth rate and immunostimulant response of hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* X *O. niloticus*). In: *The 5th International Symposium on Tilapia Aquaculture* (pp.524-532), Rio de Janeiro: Anais do ISTA, 9.
- Vadstein, O. (1997). O The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*. 155 (1-4): 401-417.
- Watanuki, H., Ota, K., Malina, A.C., Tassakka, A.R., Kato, T. & Sakai, M. (2006). Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*. 258 (1-4): 157-163.✻