

UNIVERSIDA FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

FRANCISCO JAVIER HERRERA CARVALLO

Efeito do manejo da água de cultivo (troca-zero, troca-zero com recirculação e troca diária) sobre a qualidade de água, índices de produção e biomarcadores em juvenis do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para optar ao grau de Mestre em Aqüicultura.

Orientadora: Profa Dra Maria Risoleta Freire Marques

Florianópolis
2006

Herrera-Carvalho, Francisco Javier,

Efeito do manejo da água de cultivo (troca-zero, troca-zero com recirculação e troca diária) sobre a qualidade de água, índices de produção e biomarcadores em juvenis do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei* / Francisco Javier Herrera Carvalho – 2006.

52 f : 12 figs., 5 tabs.

Orientadora: Maria Risoleta Freire Marques

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

1.Camarão; 2.*Litopenaeus vannamei*; 3.Troca zero; 4.Recirculação; 5.Renovação de água; 6.Cultivo; 7.Carcinicultura; 8.Enzimas de Estresse; 9.Glutationa-S-Transferase; 10.GST; 11.Amônia; 12.Nitrito; 13.Nitrato; 14.Fosfato; 15.Sílica; 16.Turbidez; 17.Proteínas Citosólicas; 18.Capacidade antioxidante da hemolinfa.

Efeito do manejo do cultivo (troca-zero, troca-zero com recirculação e troca diária) sobre a qualidade de água, índices de produção e biomarcadores em juvenis do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei*.

Por

Francisco Javier Herrera Carvallo

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQÜICULTURA

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

Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Maria Risoleta Freire Marques - *Orientadora*

Dr. Alcir Luiz Dafre

Dr. Luis Alejandro Vinatea Arana

Dedico este trabalho a meus pais que sempre se esforçaram em me proporcionar o melhor, tanto nos aspectos materiais como intelectual e afetivo. A toda minha família, em particular a cada um de meus cinco irmãos que sempre me deram força para enfrentar cada aventura que me proponho. Principalmente dedico este trabalho a memória de meu irmão Fernando, que sempre foi uma fonte de admiração, inspiração e lembranças motivadoras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sincera y emotivamente a meus pais que sempre me apoiaram em cada momento de minha vida, proporcionando estrutura forte e sólida para enfrentar cada novo desafio que a vida me apresenta.

Também agradeço a minha esposa Micheline que com seu apoio, paciência e carinho contribuiu para a execução deste trabalho. Além da importante ajuda técnica e científica, foi um apoio essencial nos momentos de dificuldades que somente eu e ela entendemos como foram. Um agradecimento especial a Deus pelo nascimento de meu filho e ao próprio Gabriel, que com seu rostinho lindo me fez acreditar que anjos existem e aumentar a força e a esperança para superar os momentos mais difíceis destes últimos dois anos.

Não posso deixar de agradecer de forma especial e sincera a minha Professora Risoleta, que acreditou neste trabalho e foi uma pessoa essencial para sua realização. Quero agradecer-la pela disponibilização de tudo que estava a seu alcance e por sua excelente disposição pessoal, sem a qual, haveria sido impossível a execução deste projeto.

Agradeço também a todo o pessoal do Laboratório LABCAI, em particular a Karim, Juliana, Daniela, Jacob, que sempre estiveram presentes para ajudar, discutir os assuntos deste trabalho e clarear as dúvidas presentes.

Agradeço a todo o pessoal dos Laboratórios LCM que estiveram presentes durante a execução dos bio-ensaios. Ao pessoal do Laboratório LOC, os que realizaram os análises de qualidade de água essenciais para este trabalho, particularmente a Diego, quem com muita paciência e disposição me guio sobre o referente a os parâmetros de qualidade de água.

SUMÁRIO

	RESUMO	
	ABSTRACT	
1.	INTRODUÇÃO	
	1.1 Situação da carcinicultura no Brasil	11
	1.2 Situação da carcinicultura em Santa Catarina	11
	1.3 Sistemas de cultivo e qualidade de água	13
	1.4 Biomarcadores	15
2.	OBJETIVO	18
3.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	
	3.1 Material Biológico	19
	3.2 Sistemas e condições de cultivo	19
4.	MANUSCRITO	23
	4.1. INTRODUÇÃO	24
	4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	
	4.2.1 Animais e condições de cultivo	26
	4.2.2 Qualidade de água	26
	4.2.3 Biometria dos animais	26
	4.2.4 Coleta dos animais para análise bioquímica	26
	4.2.5 Homogeneização das amostras	27
	4.2.6 Determinação de proteínas totais	27
	4.2.7 Atividade da Glutathione -S- transferase (GST) (E.C.:2.5.1.18)	27
	4.2.8 Capacidade antioxidante da hemolinfa	27
	4.2.9 Análise estatística	28
	4.3. RESULTADOS	
	4.3.1 Qualidade de água:	
	4.3.1.1 pH :	29
	4.3.1.2 Amônia (N-NH ₃)	29
	4.3.1.3 Nitrato (N-NO ₃)	29
	4.3.1.4 Nitrito (N-NO ₂)	29
	4.3.1.5 Fosfato (P-PO ₄)	30
	4.3.1.6 Silica (SiSO ₃)	30
	4.3.1.7 Turbidez	30
	4.3.2 Dados Biométricos	33
	4.3.3 Análise de biomarcadores	
	4.3.3.1 Atividade da Glutathione -S- Transferase (GST) (E.C.:2.5.1.18)	35
	4.3.3.2 Capacidade antioxidante da hemolinfa	39
	4.3.3.3 Proteínas totais	39
	4.4. DISCUSSÃO	40
	4.5. CONCLUSÃO	45
	4.6. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	46
5.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO MANUSCRITO	50

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Produção de camarão *L vannamei* em Santa Catarina entre os anos 1998 e 2005 (FONTE: ABCC). 12
- Figura 2 Visão geral da montagem do experimento: caixas plásticas de cor preta utilizadas para a manutenção dos animais e baldes e sifões utilizados no sistema aberto, com troca diária (10% do volume). 20
- Figura 3 Sistema desenhado para gerar a circulação da água do tanque, a partir da sucção de água desde a metade da coluna do tanque, mediante um air-lifter. À direita se observa o sistema por onde a água sobe pelo cano de air-lifter e entra na calha. No fundo desta última, ocorre a sedimentação de partículas no fundo da calha. A água, contendo pouco sedimento, volta novamente ao tanque, através de orifícios do lado oposto à entrada da água na calha. 20
- Figura 4 Procedimento utilizado para a troca de água dos tanques, mediante sifonamento (4^a). Em 4b, detalhe do sistema de sifonamento, desenhado para retirar água do tanque, a partir da metade da coluna de água do seu interior. O sifão possui um registro que facilita a troca e diminui o impacto do procedimento de troca de água sobre os camarões. 21
- Figura 5 Procedimentos utilizados para a biometria do animais: a- captura dos animais, usando uma rede; b- determinação do comprimento com uma régua; e, c- determinação do peso com uma balança de analítica. 22
- Figura 6 a) Ph, Concentrações de: b) amônia, c) nitrato, d) nitrito, e) fosfato, f) sílica e g) turbidez ao longo do experimento. 32
- Figura 7 a) gráfico do peso médio dos camarões registrado semanalmente. B) ganho de peso em cada semana de cultivo. Os valores se representam em (g). * indica significância ($p < 0,05$); ns indica no existe significância ($p > 0,05$). 34
- Figura 8 a) indica a converção alimentar semanal, (* indica significância ($p < 0,05$); ns indica no existe significância ($p > 0,05$). B) corresponde a converção alimentar final do experimento. As diferenças estatísticas estão indicadas por letras. 34
- Figura 9 Atividade da GST em brânquias, na transferência, aclimação, no sistema de troca 10%, no sistema estático e no sistema de recirculação. As diferenças estatísticas estão indicadas por letras. 36
- Figura 10 Atividade da GST no hepatopâncreas, na transferência, aclimação, no sistema de troca 10%, no sistema estático e no sistema de recirculação. As diferenças estatísticas estão indicadas por letras. 36
- Figura 11 Co-relações de Amônia, Nitrito e Nitrato com a atividade da GST em brânquias e heptopâncreas, segundo o teste de Spermann.* indica existe significância ($p < 0,05$); ns indica não existe significância ($P > 0,05$) 37
- Figura 12 Co-relações de, Fosfato e Turbidez com a atividade da GST em brânquias e heptopâncreas, segundo o teste de Spermann. 38
- * indica existe significância ($p < 0,05$); ns indica não existe significância ($P > 0,05$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Informações Gerais sobre a atividade de criação de camarão no Brasil em 2004	11
Tabela 2	Valores recomendados para o cultivo de <i>L.vannamei</i>	15
Tabela 3	Valores mínimos, máximos e médios \pm desvio padrão de pH, Amônia total, Nitrito, Nitrato, Fosfato, Sílica e turbidez para cada tratamento ao final do experimento.	31
Tabela 4	Valores mínimos, máximos e médios \pm desvio padrão da sobrevivência, ganho de peso final, peso médio final, e media de conversão alimentar individual.	33
Tabela 5	Proteínas totais nas brânquias, no hepatopâncreas e na hemolinfa e capacidade antioxidante da hemolinfa	39

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar dois sistemas de cultivo fechado, comparando-os com o sistema tradicional de cultivo aberto, através da avaliação de parâmetros de qualidade de água, índices de produção e alguns biomarcadores bioquímicos. Durante 30 dias, espécimes juvenis de *Litopenaeus vannamei* ($6,83 \pm 0,79$ g) foram mantidos em um sistema fechado estático (troca-zero), ou em um sistema fechado com recirculação (taxa = $10\% \text{ dia}^{-1}$), ou, ainda, em um sistema aberto com troca diária de água (10%). A temperatura, a salinidade, o oxigênio dissolvido e o pH foram monitorados diariamente. Amostras de água foram analisadas semanalmente em relação à amônia, nitrito, nitrato, fosfato, sílica e turbidez. Entre os parâmetros de qualidade de água analisados, o pH, nitrito (NO_2), nitrato (NO_3), fosfato (PO_4), e turbidez (NTU), apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos, mantendo-se, entretanto, dentro dos níveis considerados como recomendáveis para o cultivo da espécie *L.vannamei*. Os índices de produção (sobrevivência, crescimento e conversão alimentar) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. A atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST), a capacidade antioxidante total da hemolinfa, além da concentração de proteínas totais, não mostraram diferenças significativas entre os tratamentos. Aparentemente, as diferenças registradas entre os parâmetros de qualidade de água nos três sistemas de cultivo experimental, não produziram um efeito mensurável, tanto nos índices de produção como nos biomarcadores, considerando as análises realizadas.

Palavras-chave: *Litopenaeus vannamei*, biomarcadores, Glutathione – S – Transferase, GST, sistema fechado de cultivo

Effect of water culture management (zero-exchange, zero-exchange with recirculation and daily-exchange) on water quality, production performance and biomarkers on juveniles of the white-shrimp, *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate two closed systems (zero-exchange) for shrimp growth, and compare them with the traditional open system (with daily exchange), through the evaluation of water quality parameters, production indexes and some biochemical biomarkers. During 30 days, juvenile specimens of *Litopenaeus vannamei* ($6,83 \pm 0,79$ g) were maintained in a static closed system (zero-exchange), in a closed system with recirculation (recirculation rate =10% day⁻¹), and in a open system with daily change of water (change rate =10% day⁻¹). Temperature, salinity, dissolved oxygen and pH were monitored daily. Samples of water were analyzed once a week in relation to ammonium, nitrite, nitrates, phosphate, silica and turbidity. Among the water quality parameters analyzed, pH, nitrite (NO₂), nitrates (NO₃), phosphate (PO₄), and turbidity (NTU), showed significant differences ($p < 0,05$) among the treatments. However, the values were in the range considered as being suitable for the cultivation of the species *L.vannamei*. On the other hand, the production indexes (survival, growth and alimentary conversion) did not present significant differences among the treatments. The activity of the enzyme Glutathione-S-Transferase (GST), the total antioxidant capacity of the hemolymph, and the total protein concentration did not present significant differences among the treatments. Apparently, the differences registered in the water quality parameters of the three different systems of experimental cultivation did not produce a measurable effect either in the production indexes or in the biomarker responses considering the analyses performed.

Key-words: *Litopenaeus vannamei*, biomarkers, Glutathione-S-Transferase, GST, zero-water exchange culture system

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Situação da carcinicultura no Brasil

A criação de camarão marinho em viveiros no Brasil, orientada para a produção comercial, iniciou-se em 1978 com a espécie exótica *Penaeus japonicus* por iniciativa do Governo do Rio Grande do Norte, como alternativa econômica para as salinas desativadas (FROTA, 2005).

A década de 80 foi marcada pelas inúmeras tentativas de adaptação de algumas espécies de camarão nos viveiros na região nordeste, associadas à falta de financiamento e à inexistência de tecnologias de manejo adequadas. Somente em 1996, com o cultivo da espécie *Litopenaeus vannamei*, juntamente com a disponibilidade de ração de boa qualidade e domínio do ciclo de reprodução pelos laboratórios nacionais, é que o Brasil começou a expandir sua produção de camarão marinho (FROTA, *op cit*).

Atualmente, a carcinicultura no Brasil apresenta uma taxa anual de crescimento de 30% de áreas de viveiros, e 50% na produção (FROTA *op cit*). Segundo dados da Associação Brasileira dos Criadores de Camarão – ABCC, o Nordeste, com seus 3.300 km de litoral, é responsável por 94% de todo o camarão produzido no Brasil. Entre os maiores produtores estão o Rio Grande do Norte e a Bahia, mas a atividade cresce também nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Piauí. A situação brasileira referente ao cultivo de camarão está resumida na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Informações Gerais sobre a atividade de criação de camarão no Brasil em 2004

Número total de produtores	997
Área total de viveiros	16.598 propor
Produção total	75.904 toneladas
Produtividade	4.573 kg/propor./ano

Fonte: ABCC

1.2 – Situação da carcinicultura em Santa Catarina

Em Santa Catarina, a produção de camarão em cativeiro também tem se expandido de forma rápida e contínua. De acordo com a Associação Catarinense dos Criadores de Camarão – ACCC, a produção de camarão no estado saltou de 190 toneladas na safra de 1999-2000 para 3500 toneladas na safra de 2004-2005, tendo a maior produção sido registrada na safra de 2003-2004 que atingiu 4.267 toneladas, o que representou um 5,6% da produção de camarão do Brasil.

No estado, existem, atualmente, 108 fazendas de camarão em cativeiro da espécie *Litopenaeus vannamei*, sendo 93 delas localizadas em Laguna. No total, a área total de viveiros perfaz 1,4 mil hectares, sendo 70% da produção comercializada nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo e 30% destinada ao mercado de Santa Catarina.

Como observado em diversas regiões do mundo (BORGHETTI; OSTRENSKY; BORGHETTI, 2003), a carcinicultura já representa uma importante fonte de empregos diretos e indiretos no estado de Santa Catarina, envolvendo diferentes setores, como, as indústrias de ração para camarão, de equipamentos para o cultivo e de processamento.

Entretanto, como registrado em diversos países, esta importante atividade econômica não está livre de ameaças, o que caracteriza a produção destes organismos como um negócio de alto risco (ANDREATTA; BELTRAME, 2004, p.199). Recentemente, entre a safra de 2003/04, o setor sentiu uma forte pressão, devido ao surgimento de focos do vírus da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus*, WSSV) nos cultivos da região de Laguna (SEIFFERT, 2005). À esta enfermidade viral, a qual já produziu efeitos devastadores entre os principais produtores mundiais (MACIEL, 2002), pode ser atribuída a queda de aproximadamente 20% da produção na safra do ano seguinte (Figura 1), uma vez que alguns produtores se viram desestimulados em produzir sob esta ameaça e não realizaram os povoamentos de seus viveiros no ano seguinte.

Este fato reitera a relevância das condições ambientais, das condições biológicas da espécie e, especialmente, das boas praticas de manejo e dos sistemas de cultivo para a carcinicultura e, de forma análoga para os demais setores da produção aquícola.

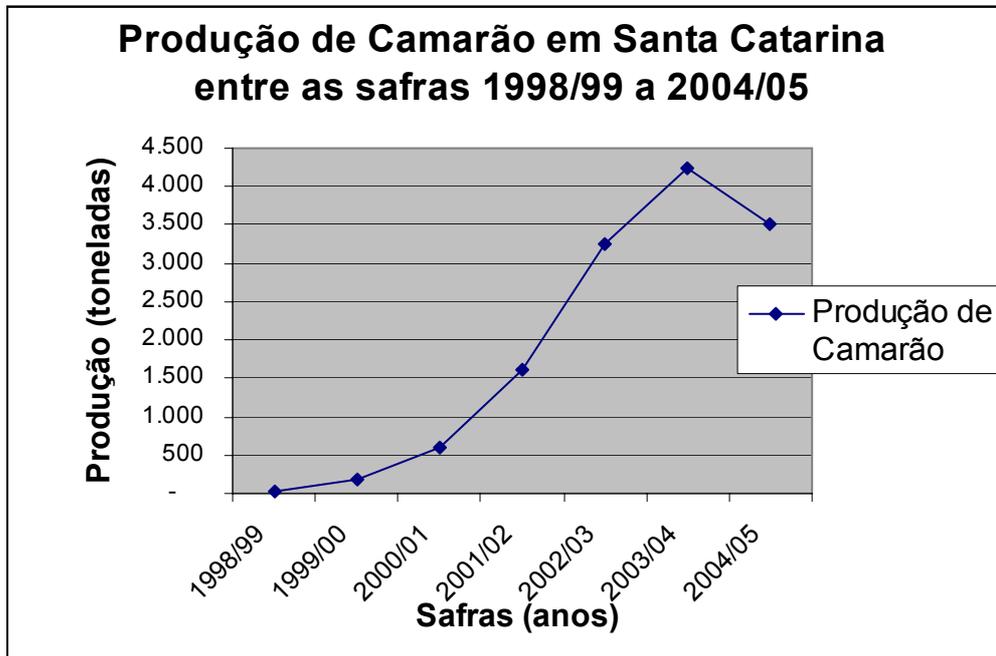


Figura 1: Produção de camarão *L. vannamei* em Santa Catarina entre os anos 1998 e 2005 (FONTE: ABCC).

1.3 – Sistemas de cultivo e qualidade de água

De forma geral, os sistemas de cultivo aquícola podem ser classificados de duas formas. Uma delas é baseada na densidade de cultivo, sendo os sistemas classificados, então, como de cultivo intensivo, semi-intensivo e extensivo. A outra forma de classificação diz respeito ao modo de interação ou intercâmbio de massas (principalmente, a água) com o meio ambiente, sendo os sistemas, neste caso, classificados como: sistemas fechados, onde não existe nenhum tipo de intercâmbio de massas entre o meio interno e externo; sistemas semi-abertos, onde o fluxo de massas entre o ambiente de cultivo e o ambiente externo ou natural é limitado ou ocorre em um só sentido (geralmente na forma de *inputs* ou entradas) e, finalmente, sistemas abertos, onde existe um grande fluxo de massas (águas) entre o sistema de cultivo e o meio circundante. Entre os sistemas abertos, também estão incluídos os sistemas completamente abertos, onde o sistema de cultivo é desenvolvido diretamente no meio ambiente, como é o caso de moluscos marinhos, peixes em gaiolas flutuantes e peixes oceânicos em baías fechadas com redes. Sob o ponto de vista das classificações acima, a escolha do sistema de cultivo a ser utilizado vai interferir, em maior ou menor grau, tanto na qualidade da água do cultivo propriamente dito, como no impacto ao ambiente circundante.

Segundo Jones, Dennison e Preston (1999) e O' Donohue et al. (1999), as fazendas de cultivo de camarão, assim como muitos sistemas de cultivo intensivo e semi-intensivo, aportam ao meio ambiente uma considerável quantidade de matéria orgânica, a qual se caracteriza por uma elevada carga de sólidos em suspensão, baixos níveis de oxigênio dissolvido, excesso de compostos nitrogenados e fosforados, bem como bactérias, microalgas e diatomáceas que podem produzir sérios desequilíbrios ecológicos nos sistemas lacustres e marinhos. Lacerda et al. (2005), mencionam que o cultivo de camarão emite para o meio ambiente quantidades elevadas de N ($1.9 \text{ t km}^{-2} \text{ ano}^{-1}$), e P ($0,23 \text{ t km}^{-2} \text{ ano}^{-1}$).

Os compostos nitrogenados e fosfatados, não vêm somente dos restos de ração e metabólitos do camarão, mas também podem ser originados a partir de fertilizantes adicionados aos tanques, com o objetivo de produzir a proliferação de microalgas necessárias para o desenvolvimento e manutenção do cultivo. Estes compostos, caso não sejam consumidos totalmente pelo sistema de cultivo, podem, juntamente com as águas de troca, ser despejados ao meio ambiente, principalmente na forma de nitratos e fosfatos. Isto pode provocar a eutrofização dos sistemas lacustres e marinhos. Este processo de eutrofização tem sido considerado como um fator com potencial real para afetar a sustentabilidade destes ambientes naturais. Hopkins et al. (1993, p. 309) estimaram que sejam necessários entre 39 a 199 ton. de água para produzir 1 kg de camarão, além de trocas de água freqüentes para permitir altas taxas de alimentação e conseqüentemente altas taxas de crescimento.

Linhas de pesquisas mais atuais sugerem que é possível trabalhar com sistemas fechados (sem troca de água) ou sistemas semi-fechados e obter rendimentos satisfatórios,

sempre que seja observada a questão da qualidade da água (MCINTOCH, 2000; MCINTOCH, 2001; COHEN, 2005). Estes novos métodos têm sido utilizados como alternativa para tentar solucionar ou diminuir não só a pressão que as fazendas de camarão podem gerar sobre os ambientes naturais, particularmente em relação à carga orgânica e aos nutrientes, mas, também, associados a programas de biossegurança, visando o controle de doenças virais, como as causadas pelo WSSV e o Vírus da Cabeça Amarela (*Yellow Head Syndrome virus*, YHV) (MENASVETA, 2002). Dentre estes métodos, podemos citar o manejo de cultivos em sistemas fechados, ou seja, sem a troca de água durante o período de cultivo, os quais são também denominados de troca-zero (BURFORD et al., 2004), além daqueles que envolvem o tratamento dos efluentes com biofiltros (moluscos) e produtores primários (macroalgas) (JONES; DENNISON; PRESTON, 1999) para diminuir a carga de nutrientes.

O sistema de cultivo denominado de troca-zero também pode representar uma alternativa economicamente viável, considerando que poderiam diminuir os custos relacionados ao bombeamento e à fertilização de água, uma vez que possibilitariam o reaproveitamento da água que apresenta salinidade, pH, fito-plâncton e fauna microbológica adequados para o cultivo. Entretanto, nestes sistemas do tipo fechado também é gerado um acúmulo de nutrientes, como nitritos, nitratos e fosfatos, os quais em altas concentrações, podem comprometer a saúde dos camarões (POLI; VINATEA, 2004), sem deixar de considerar, ainda, a questão da proliferação de doenças relacionadas ao confinamento.

Concentrações elevadas de compostos derivados do nitrogênio, como a amônia, nitritos e nitratos, podem provocar diversos desequilíbrios metabólicos em animais de cultivos aquícolas, tais como: alterações na taxa de excreção, efeitos negativos na osmorregulação, alterações respiratórias, alterações morfológicas e funcionais em órgãos, como os rins, fígado e baço e, ainda, necrose das lamelas branquiais. Também pode haver comprometimento do crescimento, dado que a amônia pode bloquear o processo de fosforilação oxidativa e causar uma incapacidade de conversão energética dos alimentos em ATP, o qual é necessário para os processos anabólicos da célula (VINATEA, 2004). Em camarões peneídeos, relatos recentes têm avaliado o efeito tóxico de concentrações elevadas de amônia sobre o crescimento, o processo de muda, o consumo de oxigênio e as respostas imunológicas desses animais (LE MOLULLAC e HAFFNER, 2000; WANG et al., 2003; WANG et al., 2005).

Basicamente, concentrações elevadas de amônia no meio aquático diminuem a excreção deste composto na maioria dos animais aquáticos, provocando um aumento da sua concentração, nos tecidos e no interior das células. Assim, no ambiente intracelular, a amônia não-ionizada (NH_3) é transformada em amônia ionizada (NH_4^+), acarretando em um aumento do pH, o que tem conseqüências sobre as reações enzimáticas e a permeabilidade de membranas (VINATEA, 2004). Assim sendo, alguns parâmetros físico-químicos têm sido recomendados para o cultivo de *L. vannamei* (Tabela 2) (MOSER 2005).

Tabela 2: Valores recomendados para o cultivo de *L.vannamei*

Parâmetros	Valores recomendáveis
Amônia total (mg/L)	0,1 - 1
Amônia não ionizada (mg/L)	< 0,1
Nitrogênio total inorgânico (mg/L)	0,5 - 2
Alcanidade (mg/L de CaCO ₃)	80 - 140
pH	7 - 9
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5 - 10
Dióxido de carbono (mg/L)	< 20
Temperatura (°C)	25 - 32
Transparência (cm)	35 - 50
Salinidade (ppm)	15 - 25
Clorofila a (mcg)	50 - 75

Fonte: Moser, 2005

1.4 – Biomarcadores:

Alterações metabólicas podem ter efeito sobre os mecanismos e as respostas de defesa humoral e celular dos animais, aumentando a susceptibilidade dos camarões às doenças (KAUTSKY et al., 2000). Estas alterações, produto da exposição dos organismos a agentes estressores ambientais, podem ser monitoradas mediante a avaliação de respostas bioquímicas e moleculares, denominadas como *biomarcadores*.

Segundo Walker et al. (1996), biomarcadores são alterações biológicas de caráter molecular, celular e fisiológico que expressam os efeitos tóxicos causados pelos contaminantes presentes no ambiente. A importância da análise de biomarcadores bioquímicos ou moleculares tem sido reconhecida, pois estas respostas apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e custo não elevado, além de serem, geralmente, as primeiras a sofrerem alterações frente à presença de um xenobótico (STEGEMAN et al., 1992; NIYOGI et al., 2001). O uso de biomarcadores, como ferramenta complementar para determinar não só o grau de exposição e toxicidade de contaminantes, como também o estresse em organismos aquáticos, já é aceito e tem sido recomendado pelo Conselho Internacional para a Exploração do Mar (ICES) (VENTURA, 2004).

A atividade de enzimas, como a ATPase, tem sido usada para avaliar o metabolismo e a funcionalidade fisiológica de camarões, uma vez que uma maior demanda de energia tem sido associada à uma maior atividade desta enzima (CHEN; NAN, 1992). Por outro lado, Wei-Na Wan et al. (2002) sugerem que a atividade da ATPase pode ser ainda utilizada como um indicador de estresse, causado pela qualidade da água.

A ativação do sistema da Profeniloxidase (propor), medida pela atividade da enzima Fenoloxidase (PO), tem sido usada para avaliar o grau de imunoestimulação em camarões (REDÓN; BALCÁZAR, 2003).

Entre os demais biomarcadores utilizados para avaliar o grau de exposição à contaminantes e/ou ao estresse oxidativo, estão incluídas as enzimas associadas ao sistema celular de defesa antioxidante e de conjugação.

Entre as enzimas de conjugação estão aquelas pertencentes à família das Glutathione-S-Transferases (GSTs).

As GSTs são um grupo de isoenzimas diméricas, associadas, principalmente, ao citosol da célula, as quais participam da fase II do processo de detoxificação celular. As GSTs conjugam compostos, originados na fase I do processo de biotransformação ou detoxificação celular, com compostos endógenos celulares, como o tripeptido glutathione (GSH), tornando-os mais hidrossolúveis e fáceis de ser excretados (LÜCHMANN, 2005). As GSTs são encontradas amplamente na natureza, em organismos eucariontes e procariontes. Em organismos aquáticos, a atividade da GST tem sido estudada amplamente em peixes e moluscos, mas poucos trabalhos têm sido realizados em crustáceos (LÜCHMANN, *op.cit.*). Trabalhos recentemente realizados por Luchmann (2005) e Moser (2005), avaliaram a GST como biomarcador nos camarões peneídeos *Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Litopenaeus vannamei*, respectivamente. Outro trabalho, recentemente publicado por Mohankumar e Ramasamy (2006), investigaram a atividade das enzimas associadas ao estresse oxidativo, entre elas a GST, em *Fenneropenaeus indicus* (no hepatopâncreas, brânquias hemolinfa e músculo), infectado pelo vírus da mancha branca, WSSV.

As avaliações das variáveis metabólicas da hemolinfa também são muito utilizadas para medir o estresse causado em condições de confinamento nos camarões (PÉREZ et al., 2006). Uma das variáveis que tem sido mais amplamente usada com este objetivo é a quantidade total de proteínas na hemolinfa (SÁNCHEZ et al., 2001; PERAZZOLO et al., 2002; PASCAOAL et al., 2004; PÉREZ et al., 2006).

A capacidade anti-oxidante do sangue também tem sido proposta como um biomarcador de estresse oxidativo em peixes (ALVES, 2003). Em invertebrados, o sistema imune se diferencia dos vertebrados, principalmente pela ausência de moléculas do tipo das imunoglobulinas e de células linfóides, e, por ser baseado em uma resposta inata.

O sistema de defesa deste grupo de animais, entre eles os crustáceos, está baseado em um conjunto de efetores celulares e humorais, os quais agem de modo conjunto para eliminar microorganismos potencialmente infecciosos (RENDON, 2003).

Os hemócitos são cruciais para as reações imunes, sendo capazes de fagocitar, encapsular e formar nódulos, e correspondem à fração celular da hemolinfa (RENDON, *op.cit.*). A porção plasmática da hemolinfa também é fundamental para a defesa imune, onde algumas proteínas estão envolvidas nas reações de defesa do organismo, entre elas, as lectinas (MARQUES; BARRACCO, 2000), além de peptídeos antimicrobianos e cascatas polipeptídicas (DA SILVA, 2004). Existe ainda um mecanismo de defesa que é responsável pela liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que são potentes microbicidas. Este mecanismo está associado à ativação da NADPH oxidase na membrana celular que catalisa a redução do oxigênio molecular para ânion superóxido (O_2^-) (DA SILVA *op.cit.*). Outras EROs podem ser geradas a partir deste sistema, atuando, não só na degradação de microorganismos patogênicos, mas podendo produzir também danos nos tecidos do

organismo. Algumas proteínas, de baixo peso molecular, presentes na hemolinfa podem atuar como agentes protetores contra os EROs (DA SILVA *op.cit.*). Esta capacidade de proteção pode se ver alterada na presença de fatores estressores, como xenobióticos. Moser (2005), demonstrou que a exposição ao composto carbofuran causou alterações na capacidade anti-oxidante da hemolinfa do camarão branco *Litopenaeus vannamei*.

Dentro deste contexto, o presente trabalho, teve como objetivo avaliar o efeito de sistemas de cultivo, abertos e fechados, caracterizados por três sistemas distintos de manejo de água, sobre os parâmetros de qualidade de água, índices de produção e alguns biomarcadores moleculares em camarão, *Litopenaeus vannamei*, em um cultivo experimental de 30 dias.

Os biomarcadores avaliados foram os seguintes: a concentração de proteínas totais na hemolinfa, a capacidade antioxidante total da hemolinfa e a atividade da GST nas brânquias e no hepatopâncreas.

Os sistemas de manejo de água foram representados pelas seguintes condições: troca-zero (sistema fechado, estático), troca-zero com recirculação (sistema fechado com movimento de água) e troca de água diária (10% do volume) (sistema aberto).

Os resultados obtidos integrarão um artigo a ser submetido para publicação no periódico *Aquaculture*.

2. OBJETIVO:

Avaliar o efeito dos sistemas de cultivo, abertos e fechados, caracterizados por formas distintas de manejo de água, troca-zero (sistema fechado, estático), troca-zero com recirculação (sistema fechado com movimento da água) e troca de água diária (10% do volume) (sistema aberto), sobre parâmetros de qualidade de água, índices de produção (sobrevivência, crescimento e conversão alimentar) e alguns biomarcadores moleculares (atividade da enzima Glutathione-S-Transferase, GST; atividade antioxidante total da hemolinfa e concentração de proteínas totais no plasma) em juvenis de camarão, *Litopenaeus vannamei*.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Material Biológico:

Foram utilizados 135 espécimes juvenis do camarão-branco *Litopenaeus vannamei*, de 6,83 g ($\pm 0,79$), obtidos do berçário do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC.

3.2 Sistemas e condições de cultivo:

Durante o experimento, os camarões foram estocados em nove tanques plásticos quadrados de 0,5 m², com capacidade para 200 l de água, em densidade de 30 camarões/m². Os tanques foram cobertos com tela de mosquiteiro de cor verde e submetidos a três sistemas distintos de manejo de água (3 tanques/sistema) (**Figura 2**):

Sistema estático (sistema fechado sem troca de água; troca zero): Foi mantida a mesma água do início ao término do cultivo experimental, não tendo sido realizada nenhuma troca ao longo do período de 30 dias.

Sistema com recirculação (sistema fechado, com movimento de água): Foi mantida a mesma água durante todo o período do cultivo experimental. O esquema de recirculação (**Figura 3**) foi montado a partir da utilização de duas calhas por tanque, cuja soma do seu espelho de água era equivalente a 10% da área do espelho da água do tanque. Para realizar a recirculação da água foi instalado um sistema de *air-lifter*, para o qual o fluxo de água foi regulado através do fluxo de ar. A taxa de recirculação do tanque foi regulada diariamente, de modo a ser equivalente a 10% do volume total de água do tanque por dia. A sucção foi desenhada para puxar a água a partir da metade da coluna de água do tanque.

Sistema com troca de água (sistema aberto, com troca de água diária; 10% do volume): Foi realizada a troca de água diariamente, de um volume correspondente a 10% da água total do tanque. A água foi retirada por meio de um sifão, sendo reposto o mesmo volume de água marinha filtrada (filtro de 100 micra) (**Figura 4a**). A salinidade foi regulada a 20 ppm. O sifão foi instalado de tal maneira que permitisse a retirada da água a partir da metade da coluna de água, como mostrado na **Figura 4b**.

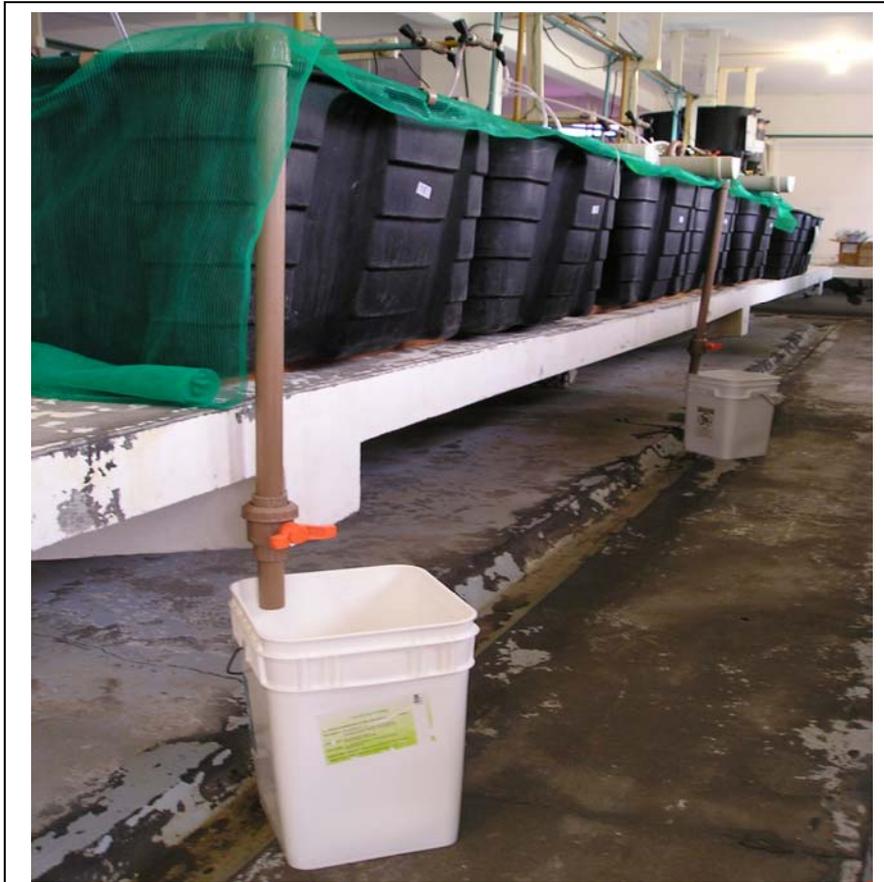


Figura 2: Visão geral da montagem do experimento: caixas plásticas de cor preta utilizadas para a manutenção dos animais e baldes e sifões utilizados no sistema aberto, com troca diária (10% do volume).



Figura 3: Sistema desenhado para gerar a circulação da água do tanque, a partir da sucção de água desde a metade da coluna do tanque, mediante um *air-lifter*. À direita se observa o sistema por onde a água sobe pelo cano de *air-lifter* e entra na calha. No fundo desta última, ocorre a sedimentação de partículas no fundo da calha. A água, contendo pouco sedimento, volta novamente ao tanque, através de orifícios do lado oposto à entrada da água na calha.



Figura 4: Procedimento utilizado para a troca de água dos tanques, mediante sifonamento (a). Em (b), detalhe do sistema de sifonamento, desenhado para retirar água do tanque, a partir da metade da coluna de água do seu interior. O sifão possui um registro que facilita a troca e diminui o impacto do procedimento de troca de água sobre os camarões.

Níveis de Oxigênio: A aeração foi mantida constante para todos os tratamentos, com níveis de oxigênio na média de 6,7 mg/L ($\pm 0,6$) durante todo o experimento. A aeração foi regulada manualmente duas vezes por dia.

Temperatura: A temperatura da água dos tanques foi regulada e mantida a 26°C ($\pm 1,9$), utilizando-se aquecedores elétricos.

Salinidade: A salinidade foi mantida a 20 ppm ($\pm 1,1$), sendo ajustada com água doce não-clorada filtrada (filtro de 100 micra), quando necessário.

Luz: Os animais foram mantidos sob luz natural durante o dia e, devido a realização simultânea de outro experimento no recinto, as lâmpadas da sala foram mantidas acesas durante a noite.

Alimentação: Os animais foram alimentados com ração comercial com 35% de proteína. A alimentação foi oferecida em bandejas de alimentação a 3% da biomassa do tanque, em duas vezes ao dia. O alimento não consumido foi quantificado e eliminado.

Coleta de amostras de água: Amostras de água foram coletadas semanalmente para análise dos seguintes parâmetros: amônia (NH_3), nitrato (NO_3), nitrito (NO_2), fosfato (PO_4), sílica (SiO_3) e turbidez (NTU).

Biometria dos animais: Semanalmente, o peso e o comprimento de todos os animais foram determinados (**Figura 5**). Com base nestes dados, o ganho em peso e a conversão alimentar foram calculados para cada tratamento.

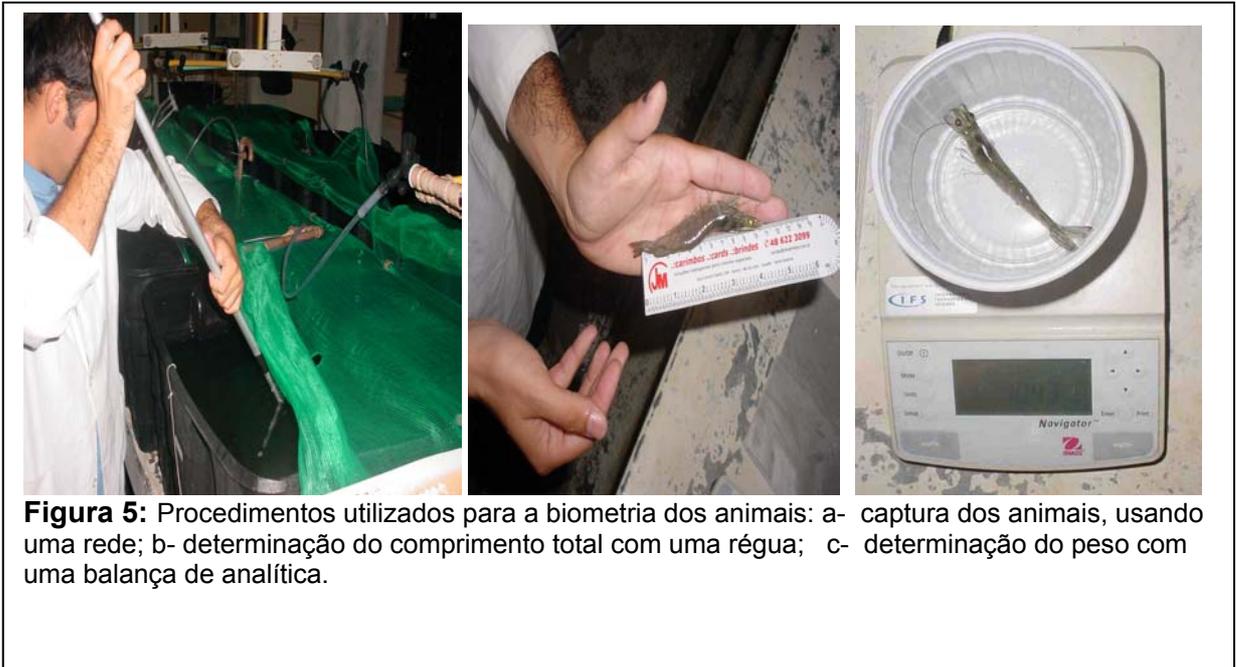


Figura 5: Procedimentos utilizados para a biometria dos animais: a- captura dos animais, usando uma rede; b- determinação do comprimento total com uma régua; c- determinação do peso com uma balança de analítica.

“Efeito do manejo da água de cultivo (troca-zero, troca-zero com recirculação e troca diária) sobre a qualidade de água, índices de produção e alguns biomarcadores em juvenis do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei*.”

Francisco J. Herrera Carvalho ^{a,b}, Elpidio Beltrame ^c Maria Risoleta Freire Marques ^{a*}.

^a *Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamentos de Bioquímica. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis Brasil.*

^b *Mar do Sul Aqüicultura Ltda., Rua Cecília Jacinta de Jesus 595; Cep: 88048-422, Florianópolis-SC-Brasil.*

^c *Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis Brasil.*

* Autor para Correspondência: Tel: 55-48-3721 9692; Fax 55-48-3721 9672
E-mail: risomar@mbox1.ufsc.br (M.R.F.Marques)

4.1. INTRODUÇÃO

A carcinicultura no Brasil tem crescido em torno de 20% ao ano nesta última década (ABCC 2003). Esta expansão também tem sido registrada de forma rápida e contínua no estado de Santa Catarina. Entre o ano de 1998 e 2004, a produção de camarão no estado aumentou de 50 para 4.267 toneladas. Neste mesmo período, o número de instalações ativas no setor cresceu de 3 para 95 fazendas (INSTITUTO CEPA/SC, 2001; ABCC, 2004).

Segundo Jones *et al.* (1999) e O' Donohue *et al.* (1999), as fazendas de cultivo de camarão, assim como muitos sistemas de cultivo intensivo e semi-intensivo, aportam ao meio ambiente uma quantidade considerável de matéria orgânica, a qual se caracteriza por uma elevada carga de sólidos em suspensão, baixos níveis de oxigênio dissolvido, excesso de compostos nitrogenados e fosforados, bem como bactérias, microalgas e diatomáceas, o que pode causar sérios desequilíbrios ecológicos nos sistemas lacustres e marinhos. Lacerda *et al.* (2005), mencionam que o cultivo de camarão emite para o meio ambiente quantidades elevadas de N ($1.9 \text{ t km}^{-2} \text{ ano}^{-1}$), e P ($0,23 \text{ t km}^{-2} \text{ ano}^{-1}$).

Novos métodos têm sido utilizados como alternativa para tentar diminuir a pressão que as fazendas de camarão podem gerar sobre os ambientes naturais, particularmente em relação à carga orgânica e de nutrientes, bem como minimizar a disseminação de doenças virais, como aquelas causadas pelo Vírus da Cabeça Amarela (YHV) e Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) (MENASVETA 2002). Dentre estes métodos, podemos citar os cultivos realizados em sistemas fechados, os quais não envolvem a troca de água durante o período de cultivo, também denominados de troca-zero (BURFORD *et al.*, 2004). Os sistemas de cultivo denominados de troca-zero podem representar uma alternativa economicamente viável, podendo diminuir os custos relacionados ao bombeamento de água, uma vez que possibilitariam o reaproveitamento da água que apresenta salinidade, pH, fito-plâncton e fauna microbiológica adequados para o cultivo. Entretanto, nestes sistemas do tipo fechado também é gerado um acúmulo de nutrientes, como nitritos, nitratos e fosfatos que, em altas concentrações, podem comprometer a saúde dos camarões (VINATEA, 2004). Como conseqüência, o confinamento poderia, potencialmente, contribuir tanto para uma maior incidência, quanto para a proliferação de doenças associadas às condições por ele propiciadas.

Concentrações elevadas de compostos derivados do nitrogênio, como a amônia, nitritos e nitratos, podem provocar diversos desequilíbrios metabólicos em animais de cultivos aquícolas, tais como: alterações na taxa de excreção, na osmorregulação, alterações respiratórias, alterações morfo-funcionais em órgãos, como os rins, fígado e baço e, ainda, necrose das lamelas branquiais. Além disso, estes compostos, quando presentes em concentrações elevadas, podem bloquear o processo de fosforilação oxidativa, e conseqüentemente, a síntese de ATP, alterando, por exemplo, o crescimento. (VINATEA, 2004). Elevadas concentrações de amônia no meio aquático diminuem a excreção deste composto na maioria dos animais aquáticos, provocando um aumento da concentração de amônia no tanque, nos tecidos e no interior das células. Assim, no ambiente intracelular, a amônia não-ionizada (NH_3) é transformada em amônia ionizada (NH_4^+), acarretando um

aumento do pH, o que tem conseqüências sobre as reações enzimáticas e a permeabilidade de membranas (VINATEA, op.cit.).

As alterações citadas acima podem envolver ainda as respostas relacionadas aos mecanismos de defesa antioxidante, defesa humoral e defesa celular dos camarões, aumentando a susceptibilidade dos animais às doenças (KAUTSKY *et al.*, 2000). Estas alterações, produto da exposição dos organismos a agentes estressores e contaminantes ambientais, podem ser monitoradas mediante a avaliação de respostas biológicas de caráter molecular, celular e fisiológico que expressam os efeitos tóxicos causados por estes agentes sobre os organismos, conhecidas como *biomarcadores* (WALKER, 1996).

A utilização de biomarcadores bioquímicos tem sido sugerida como ferramenta viável em avaliações ecotoxicológicas de ambientes aquáticos e dos efeitos de contaminantes sobre os organismos, por indicar o grau de impacto dos contaminantes em uma maneira dose ou tempo dependente (MAYER *et al.*, 1992).

Dentre os biomarcadores mais empregados destaca-se a família de isoenzimas de conjugação, Glutathione-S-Transferases (GST), as quais atuam nas reações de fase II do processo de biotransformação de xenobióticos, toxinas e compostos endógenos. As GST conjugam compostos eletrofílicos com substratos endógenos, como, por exemplo, o tripeptídeo glutathione (GSH), os tornando mais hidrossolúveis e mais facilmente excretáveis. Apesar de amplamente utilizada como biomarcador em programas de monitoramento ambiental (FITZPATRICK *et al.*, 1997; CHEUNG *et al.*, 2002; VENTURA *et al.*, 2002; MANDUZIO *et al.*, 2004) e de vários estudos em moluscos e peixes, apenas recentemente, investigações sobre esta enzima têm sido realizadas em crustáceos (BAHAVAN *et al.*, 2001; GOWLAND *et al.*, 2002; VINAGRE *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2005).

Outros parâmetros que podem sofrer alterações em condições de estresse são a capacidade antioxidante e os níveis de metabólitos da hemolinfa (PÉREZ *et al.*, 2006). Alguns estudos têm ainda investigado a variação na concentração de proteínas totais na hemolinfa e em outros tecidos como biomarcador potencial de estresse em crustáceos e outros invertebrados (SÁNCHEZ *et al.*, 2001; PERAZZOLO *et al.*, 2002; PASCOAL *et al.*, 2004; PÉREZ *et al.*, 2006).

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três estratégias distintas de manejo de água de cultivo sobre alguns biomarcadores bioquímicos no camarão-branco, *Litopenaeus vannamei*. Os animais foram mantidos em um cultivo experimental por 30 dias, sob diferentes sistemas de manejo de água, representados pelas seguintes condições: troca-zero (sistema fechado, estático), troca-zero com recirculação (sistema fechado, com recirculação) e troca de água diária (10% do volume) (sistema aberto). Foram avaliadas a atividade enzimática da GST total em brânquias e hepatopâncreas, a concentração de proteínas totais na hemolinfa, brânquias e hepatopâncreas, e a capacidade antioxidante da hemolinfa. Paralelamente, foram avaliados parâmetros biométricos de sobrevivência, crescimento e conversão alimentar, bem como parâmetros físico-químicos de qualidade de água.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Animais e condições de cultivo

Foram utilizados espécimes juvenis ($n=135$) do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei*, de $6,83 \pm 0,79$ g, oriundos do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) do Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC.

Os animais foram transferidos para nove tanques plásticos de formato quadrado, de $0,5 \text{ m}^2$, com capacidade para 200 l, em uma densidade de 30 camarões/ m^2 , onde foram mantidos em aclimação por um período de cinco dias, sob condições controladas de pH, temperatura e salinidade. Ao término deste período, os animais foram mantidos, por um período de 30 dias, sob condições distintas de manejo de água de cultivo: troca-zero (sistema fechado, estático), troca-zero com recirculação (sistema fechado, com recirculação) e troca de água diária (10% do volume) (sistema aberto). Cada tratamento foi realizado em triplicata.

Em todos os tratamentos, ao longo de todo o experimento, a aeração foi mantida constante, em níveis de oxigênio na faixa de $6,7 \pm 0,6$ mg/L. A temperatura foi mantida em $26 \pm 1,9$ °C por aquecedores elétricos, enquanto a salinidade permaneceu a $20 \pm 1,1$ ‰, tendo sido ajustada com água doce desclorada, quando necessário. Os animais foram alimentados com ração comercial, contendo 35% de proteína, em uma relação de 3% do peso da biomassa do tanque, corrigido semanalmente.

4.2.2 Qualidade de água

A salinidade, o Oxigênio dissolvido (mg/L), a saturação de Oxigênio (%), a temperatura (°C) e o pH foram determinados diariamente nos tanques.

Amostras de água foram coletadas semanalmente para análise de amônia (NH_3), nitrato (NO_3), nitrito (NO_2), fosfato (PO_4) e sílica (SiO_3). A turbidez (NTU) foi também registrada periodicamente, ao longo do experimento.

4.2.3 Biometria dos animais

O peso e o comprimento dos animais foram determinados, individualmente, no início do experimento, e uma vez a cada semana, ao longo do cultivo experimental. O ganho em peso e a conversão alimentar foram calculados para cada tratamento, sendo as médias semanais comparadas entre si e entre os tratamentos.

4.2.4 Coleta dos animais para análise bioquímica

As coletas dos animais para as análises bioquímicas foram realizadas no momento da transferência dos animais para os tanques ($n=5$), ao final do período de aclimação de cinco dias ($n=5$), e ao término dos 30 dias de cultivo ($n= 45$).

Amostras de hemolinfa foram coletadas por punção ventral, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, utilizando-se uma seringa com agulha hipodérmica, contendo solução anticoagulante (citrato de sódio 10%), na relação 1:1 (v/v).

Após a coleta da hemolinfa, os animais foram mantidos em gelo por alguns minutos, sendo, em seguida, realizada a excisão das brânquias e do hepatopâncreas. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, sendo, posteriormente, armazenados a -85°C , até a realização das análises bioquímicas.

4.2.5 Homogeneização das amostras

As amostras de hepatopâncreas e de brânquias de cada animal foram pesadas e homogeneizadas em um volume de tampão de homogeneização (Tris-HCl 0,02M; Sacarose 0,25 M; DTT 2 mM; PMSF 0,1 mM, pH 8,0), na relação de 1: 4 (g/mL).

O homogeneizado das brânquias foi centrifugado a 18,000 xg por 20 minutos a 4°C , do hepatopâncreas foi centrifugado a 9,000 xg por 25 minutos a 4°C . O sobrenadante desta última centrifugação foi submetido a uma nova centrifugação a 38,000 xg por 70 minutos a 4°C . As frações foram separadas em alíquotas, as quais foram armazenadas a -85°C para a análise posterior.

4.2.6 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry, modificado por Peterson (1977), utilizando-se soro albumina bovina (Fração V, Sigma Chemical Co.) como padrão. O procedimento foi adaptado para micro-placa (96 poços), sendo a absorbância determinada em um leitor de ELISA (TECAN-Sunrise®),

4.2.7 Atividade da Glutathione -S- transferase (GST) (E.C.:2.5.1.18)

A atividade da GST no hepatopâncreas e nas brânquias foi determinada segundo o método de Keen *et al.*, 1976, o qual é baseado na substituição do cloro da molécula de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 2mM pelo ânion tiol da glutathione reduzida (GSH). A reação foi monitorada a 340 nm durante 2 minutos. A atividade específica da enzima foi expressa em μmol de produto formado por minuto por miligrama de proteína. Para o cálculo da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção molar (ϵ) de $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.2.8 Capacidade antioxidante da hemolinfa

A capacidade antioxidante da hemolinfa foi avaliada *in vitro* pelo ensaio descrito por Gutteridge & Quilan (1993), nas condições adaptadas por Moser, 2005. O fundamento do método está baseado na inibição da degradação da desoxirribose pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2 8,8 mM), na presença de ferro (Fe 1mM) e ácido ascórbico (7,5 mM) em tampão fosfato (80 mM, pH 7,4). A

capacidade antioxidante foi expressa em percentagem de inibição, em relação à degradação total da desoxirribose.

4.2.9 Análise estatística

A normalidade dos dados foi conferida pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Para verificar a diferença entre os tratamentos foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA), quando as diferenças entre as médias foram significantes ($p \leq 0,05$) foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey. Para dados não paramétricos foi utilizado o teste Kruscal-Wallis, seguido do teste complementar de comparação múltipla de Dunns. Para a correlação dos dados foi usado o teste de Spearman ($\alpha = 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software *GraphPad Prism* para o Windows, versão 4.0.

4.3. RESULTADOS

4.3.1 Qualidade de água:

4.3.1.1 pH

O pH da água manteve-se sem diferenças entre os três tratamentos até o vigésimo dia de cultivo. Após este período, observou-se uma diminuição progressiva do pH no tratamento estático (sistema fechado, troca-zero) até o vigésimo - sétimo dia (Figura 6 a). A partir de então, foi registrada uma queda brusca de pH, a qual se manteve até o final do experimento (30 dias).

Ao final do experimento, o sistema estático (sistema fechado, troca-zero) apresentou valores de pH ($\text{pH}=7,82\pm 0,16$) significativamente mais baixos, quando comparado com o sistema fechado, com recirculação ($\text{pH}=8,01\pm 0,03$) e com o sistema aberto, com troca de água diária ($\text{pH}=8,13\pm 0,01$). Entre estes dois últimos sistemas, não houve diferença significativa em relação aos valores finais de pH da água.

4.3.1.2 Amônia (N-NH_3)

De modo geral, foi observado que a concentração de amônia diminuiu ao longo do experimento, em todos os tratamentos. Ao trigésimo dia, os valores (mg L^{-1}) registrados foram iguais a $0,137\pm 0,08$; $0,050\pm 0,08$ e zero para o sistema com recirculação, sistema estático e com troca diária, respectivamente.

No sistema com recirculação, a concentração de amônia manteve-se mais elevada até a terceira semana ($0,93\pm 0,0$) de experimento, quando comparada àquela dos outros tratamentos, estático ($0,05\pm 0,0$) e troca ($0,41\pm 0,0$). Por outro lado, uma diminuição mais rápida da concentração de amônia foi observada no sistema estático, tendo sido registrados valores próximos à zero ($0,04\pm 0,05$), na segunda semana de experimento (Figura 6 b).

Ao final dos 30 dias de experimento, a concentração de amônia não mostrou diferenças significativas entre os três tratamentos (Tabela 3).

4.3.1.3 Nitrato (N-NO_3)

Nos três tratamentos, foi observado um aumento nos níveis de nitrato ao longo do experimento.

O aumento maior e mais rápido foi registrado no sistema estático (sistema fechado, troca-zero), onde o valor final alcançado foi significativamente maior quando comparado com os outros dois tratamentos (Figura 6 c).

Em relação aos outros dois tratamentos, não foi observada uma diferença significativa entre este sistema e o sistema aberto (troca 10%) e o sistema com recirculação (Tabela 3).

4.3.1.4 Nitrito (N-NO_2)

Ao longo do experimento, os valores de nitrito nos três sistemas mostraram uma tendência semelhante, até a terceira semana (Figura 6 d).

Após este período, na amostragem subsequente, foi observada uma queda nestes valores, tanto no sistema estático, como no sistema com recirculação. Por outro lado, esta variação não foi observada no sistema com troca diária (10%) (Figura 6 d).

Os valores finais de nitrito (médias) mostraram uma diferença significativa entre o sistema estático e o sistema com troca diária (10%). Isto não foi evidenciado na comparação entre o sistema estático e o sistema com recirculação, nem tampouco entre os sistemas com recirculação e com troca diária (10%) (Tabela 3).

4.3.1.5 Fosfato ($P-PO_4$)

Houve um aumento significativo nos níveis de fosfato ao longo do experimento, tanto no sistema estático, como no sistema com recirculação. Comparativamente, no sistema com troca diária (10%), o aumento observado, a partir da terceira semana do experimento até o final do experimento, foi significativamente menor (Figura 6 e).

Ao final do experimento, os valores de fosfato determinados no tratamento de troca diária (10%) foram significativamente mais baixos, quando comparado com os outros dois tratamentos (Tabela 3).

Não houve diferença significativa entre o sistema estático e o sistema com recirculação (Tabela 3).

4.3.1.6 Sílica ($SiSO_3$)

De modo geral, foi observado um leve aumento na sílica para todos os tratamentos ao longo do experimento. (Figura 6 f).

Ao final do experimento, a comparação entre os tratamentos não revelou diferenças significativas em relação a este parâmetro (Tabela 3).

4.3.1.7 Turbidez

No sistema estático (fechado, troca-zero), foi registrado um aumento progressivo na turbidez ao longo do experimento. Enquanto nos sistemas fechado com recirculação e no sistema com troca-diária (10%), registrou-se, na última semana, uma diminuição significativa quando comparada com o sistema estático (Figura 6 g).

Pôde ser observada ainda uma tendência de valores médios inferiores deste parâmetro no sistema com recirculação durante todo o experimento (Figura 6 g).

Ao final do experimento, os sistemas de recirculação e de troca-diária (10%) não apresentaram diferenças significativas entre si, enquanto o sistema estático mostrou uma turbidez significativamente maior em relação aos outros dois tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3: Valores mínimos, máximos e médios \pm desvio padrão de pH, Amônia total, Nitrito, Nitrato, Fosfato, Sílica e Turbidez para cada tratamento ao final do experimento.

	Tratamento	Mínimo	Máximo	Media \pm DP	
pH	Estático	7,38	8,10	7,82 \pm 0,16	^b
	Recirculação	7,65	8,13	8,02 \pm 0,09	^a
	Troca 10%	7,57	8,16	8,01 \pm 0,12	^a
Amônia Total -N(N-NH ₃) (mg/l)	Estático	0,04	1,56	0,47 \pm 0,67	^a
	Recirculação	0,14	1,56	0,89 \pm 0,47	^a
	Troca 10%	0,00	1,56	0,62 \pm 0,65	^a
Nitrito - N (N-NO ₂) (mg/l)	Estático	0,10	1,63	0,97 \pm 0,54	^a
	Recirculação	0,09	1,66	1,01 \pm 0,55	^{ab}
	Troca 10%	0,09	1,49	1,01 \pm 0,54	^b
Nitrato (N-NO ₃) (mg/L)	Estático	0,03	6,26	3,46 \pm 2,52	^b
	Recirculação	0,02	6,26	2,46 \pm 2,36	^a
	Troca 10%	0,15	6,26	2,36 \pm 2,10	^a
Fosfato (P-PO ₄) (mg/l)	Estático	0,68	8,28	3,71 \pm 2,91	^a
	Recirculação	0,46	8,28	3,52 \pm 2,97	^a
	Troca 10%	0,54	8,28	2,56 \pm 2,85	^b
Sílica (Si-SiO ₃) (mg/l)	Estático	0,38	2,25	1,66 \pm 0,68	^a
	Recirculação	0,38	2,56	1,89 \pm 0,84	^a
	Troca 10%	0,38	2,42	1,67 \pm 0,69	^a
Turbidez (NTU)	Estático	5,50	121,00	32,66 \pm 44,03	^b
	Recirculação	3,50	121,00	24,51 \pm 47,30	^a
	Troca 10%	4,80	121,00	27,26 \pm 45,98	^a

Os valores correspondem aos valores mínimos e máximos e às médias \pm desvio padrão (SD). Os valores de amônia, nitrito, nitrato, fosfato e sílica estão expressos em mg/l. Os valores de turbidez estão expressos em (NTU). As diferenças estatísticas estão indicadas por letras diferentes.

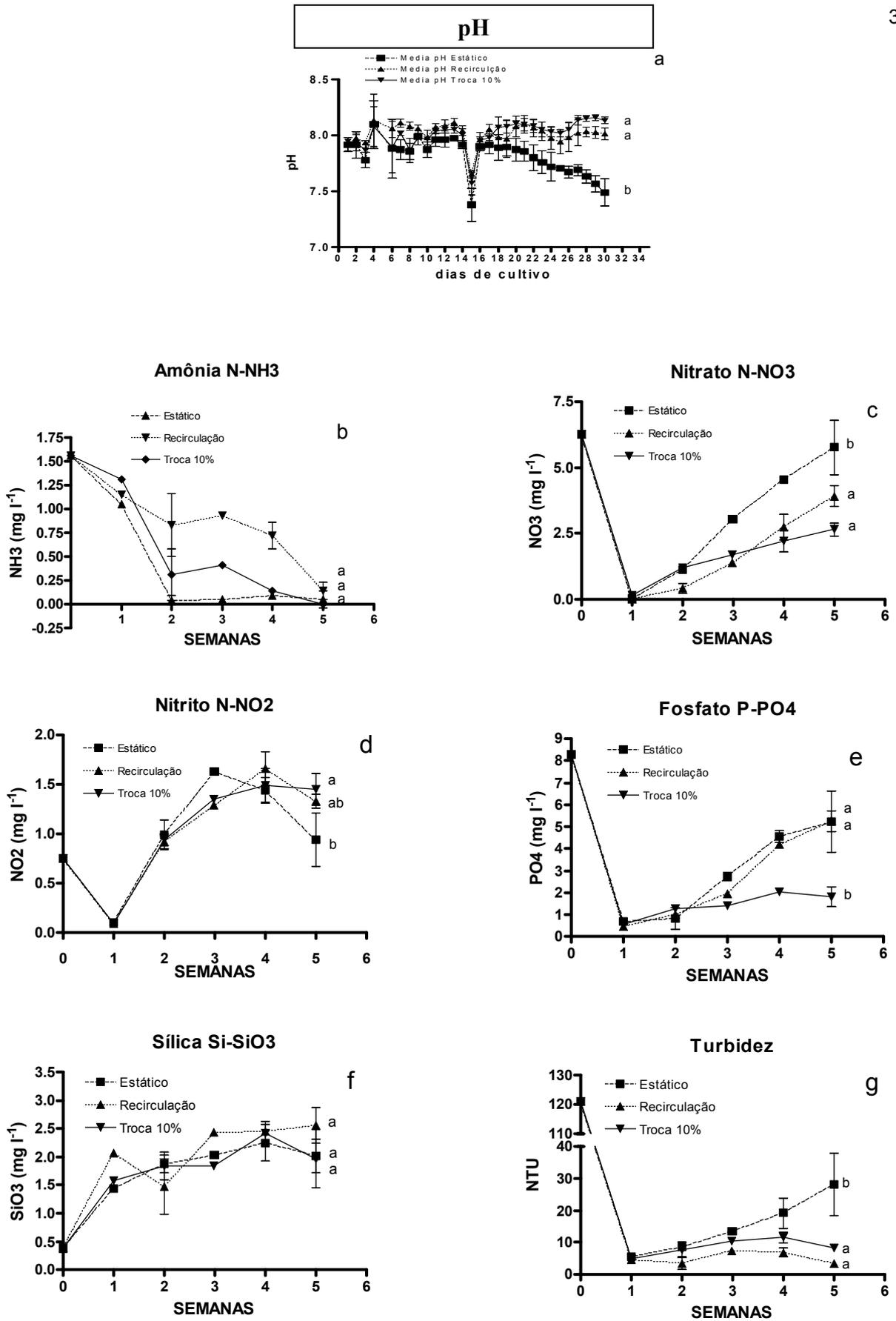


Figura 6: Valores ao longo do experimento de: a) pH, Concentrações de: b) amônia, c) nitrito, d) nitrato, e) fosfato, f) sílica. Em g): turbidez.

4.3.2 Dados Biométricos

Não foi observada mortalidade de animais, em nenhum dos três sistemas de manejo de água utilizados durante o período do experimento.

O crescimento, representado pela média de peso semanal e pelo ganho de peso semanal, não mostrou diferenças significativas entre os três sistemas, quer seja durante o experimento, ou ao término do mesmo (Figura 7a, 7b e Tabela 4)

Apesar de não ter sido observada diferença estatística em relação à conversão alimentar nos três sistemas, em nenhum momento ao longo do experimento (Figura 8 e Tabela 4), poder-se-ia sugerir uma tendência de uma conversão alimentar maior no sistema com troca de água 10% (sistema aberto), quando são consideradas as médias dos valores registrados para este parâmetro. A análise da biomassa total dos tanques e o peso médio dos animais nos diferentes sistemas parecem indicar também esta tendência.

Tabela 4: Valores mínimos, máximos e médios \pm desvio padrão da sobrevivência, ganho de peso final, peso médio final, e media de conversão alimentar individual.

	Tratamento	Mínimo	Máximo	Média	
Sobrevivência (%)	Estático	100	100	100 \pm 0,00	a
	Recirculação	100	100	100 \pm 0,00	a
	Troca 10%	100	100	100 \pm 0,00	a
Ganho médio em peso Final (g) (final-inicial)	Estático	2,61	3,22	2,84 \pm 0,33	a
	Recirculação	2,26	3,08	2,71 \pm 0,41	a
	Troca 10%	1,88	3,40	2,53 \pm 0,78	a
Peso medio final (g)	Estático	9,31	9,88	9,50 \pm 0,32	a
	Recirculação	9,44	9,50	9,48 \pm 0,04	a
	Troca 10%	9,06	9,55	9,30 \pm 0,25	a
Conversão alimentar Final (CA)	Estático	2,06	2,15	2,09 \pm 0,05	a
	Recirculação	1,77	2,45	2,07 \pm 0,35	a
	Troca 10%	2,08	4,39	2,90 \pm 1,30	a

Os valores correspondem aos valores mínimos e máximos e às médias (\pm desvio padrão - SD). A sobrevivência está expressa em %. Os valores de ganho médio em peso e peso médio final estão expressos em (g). CA = valores de conversão alimentar. As diferenças estatísticas estão indicadas por letras.

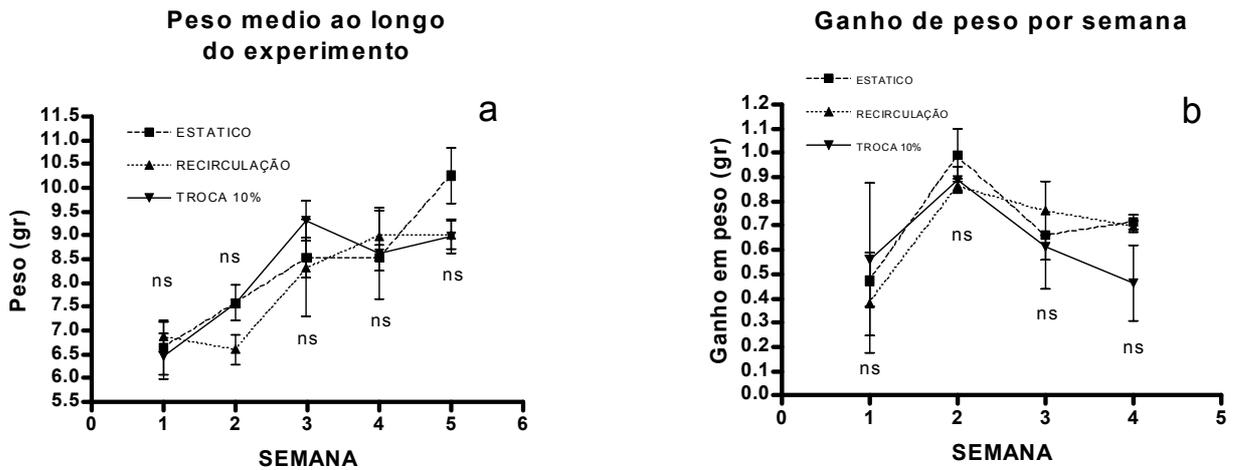


Figura 7: a) Peso médio dos camarões registrado semanalmente. b) Ganho de peso em cada semana de cultivo. ns = indica que não existe significância ($p > 0,05$).

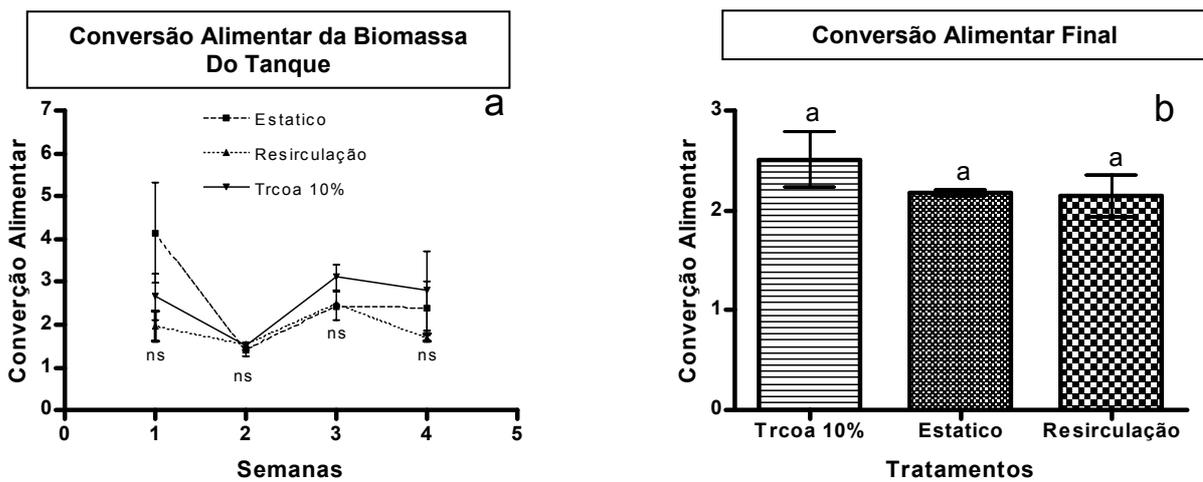


Figura 8: a) Conversão alimentar semanal, (* indica significância; $p < 0,05$); ns indica que não existe significância ($p > 0,05$). b) corresponde à conversão alimentar final do experimento. As diferenças estatísticas estão indicadas por letras diferentes.

4.3.3 Análise de biomarcadores

4.3.3.1 Atividade da Glutathione -S- Transferase (GST) (E.C.:2.5.1.18)

A atividade da GST total nos tecidos analisados, brânquias e hepatopâncreas, não apresentou diferença significativa entre o momento da transferência (t0) e ao final do período de aclimatação (t1).

Por outro lado, ao comparar a atividade da GST total em brânquias, tanto nos tempos t0 e t1, com aquelas determinadas ao final de todos os três tratamentos (t2), observou-se diferença significativa (Figura 9). No entanto, em relação aos sistemas de manejo de água no tempo (t2): troca-zero (estático), troca-zero com recirculação e troca diária de 10%, não foram observadas diferenças significativas na atividade da GST total nos tecidos analisados, brânquias e hepatopâncreas (Figura 9 e Figura 10).

A atividade da GST total não mostrou correlação com os níveis de amônia, nitrito e nitrato determinados nas amostras de água (Figura 11). Entretanto, em relação ao fosfato, foi observada uma correlação positiva com a atividade da GST das brânquias e uma correlação negativa com a atividade da GST do hepatopâncreas (Figura 12).

A turbidez e a atividade da GST não mostraram correlação em nenhum dos tecidos analisados.

Independente do tratamento e do sexo dos espécimes, a comparação do padrão da atividade da GST total nos dois tecidos analisados mostrou uma atividade aproximadamente dez vezes maior nas brânquias, em comparação àquela detectada no hepatopâncreas.

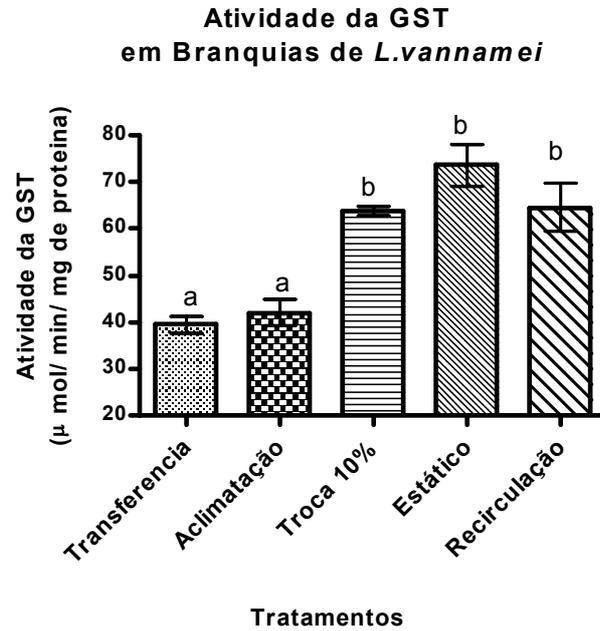


Figura 9: Atividade da GST total em brânquias, na transferência e ao final da aclimação, no sistema de troca 10%, no sistema estático e no sistema de recirculação. As diferenças estatísticas estão indicadas por letras.

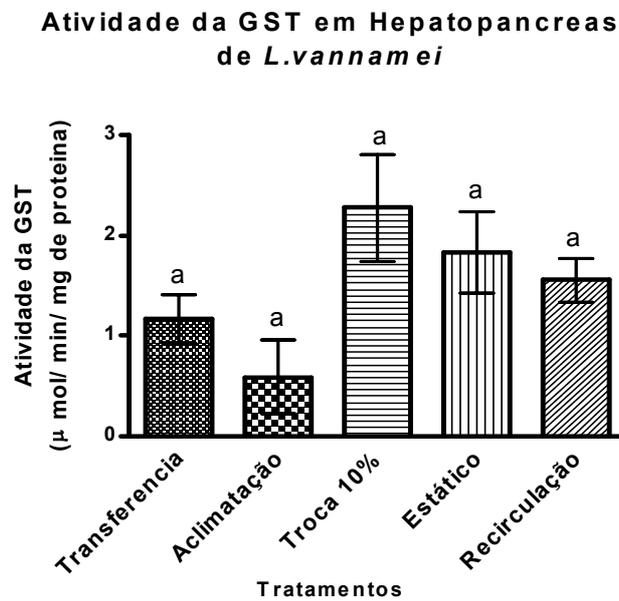


Figura 10: Atividade da GST total no hepatopâncreas, na transferência e ao final da aclimação, no sistema de troca 10%, no sistema estático e no sistema de recirculação. As diferenças estatísticas estão indicadas por letras.

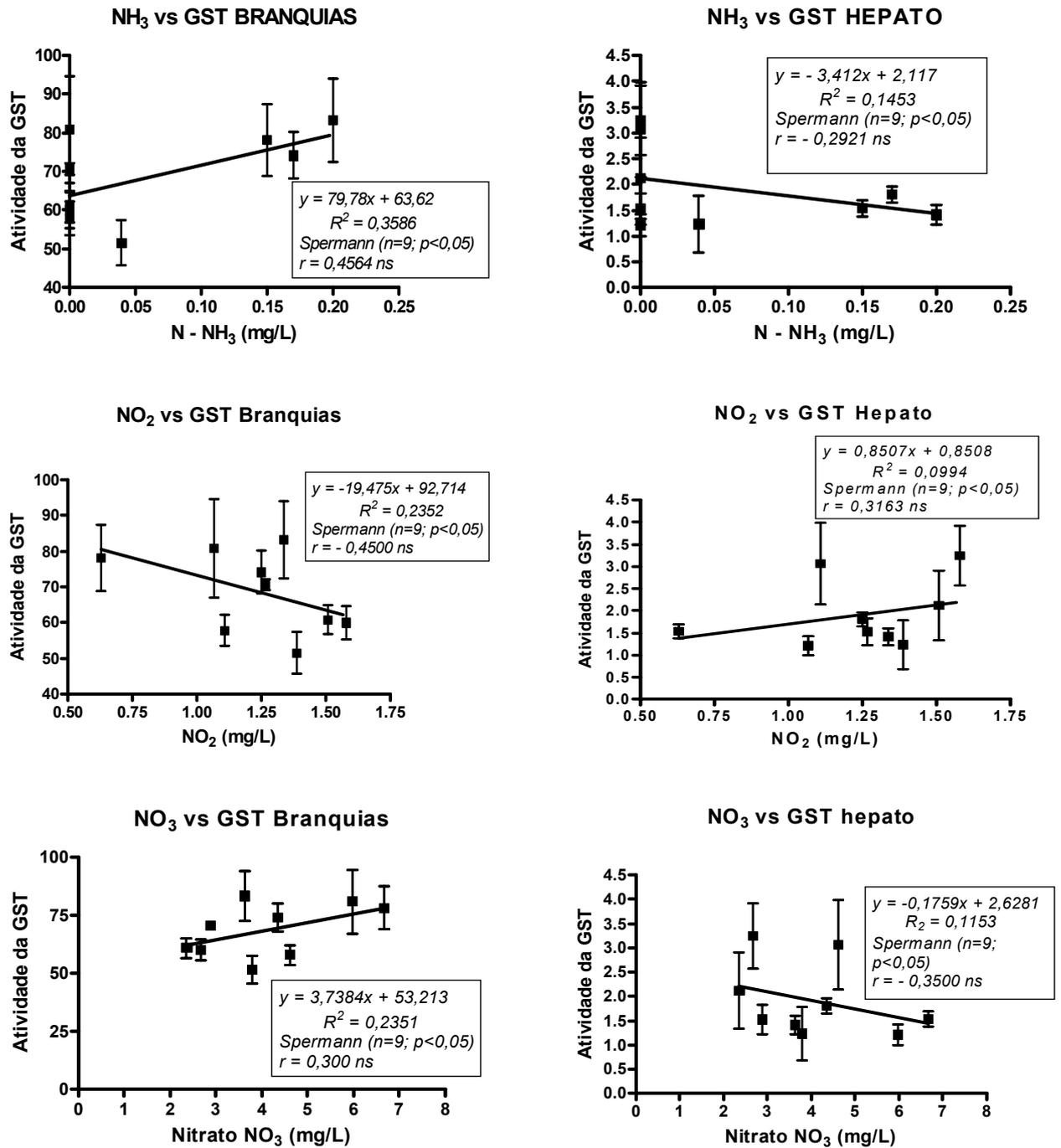


Figura 11: Co-relações de Amônia, Nitrito e Nitrato com a atividade da GST total em brânquias e heptopâncreas, segundo o teste de Spermann.

- indica significância (p < 0,05); ns indica ausência de significância (p > 0,05).

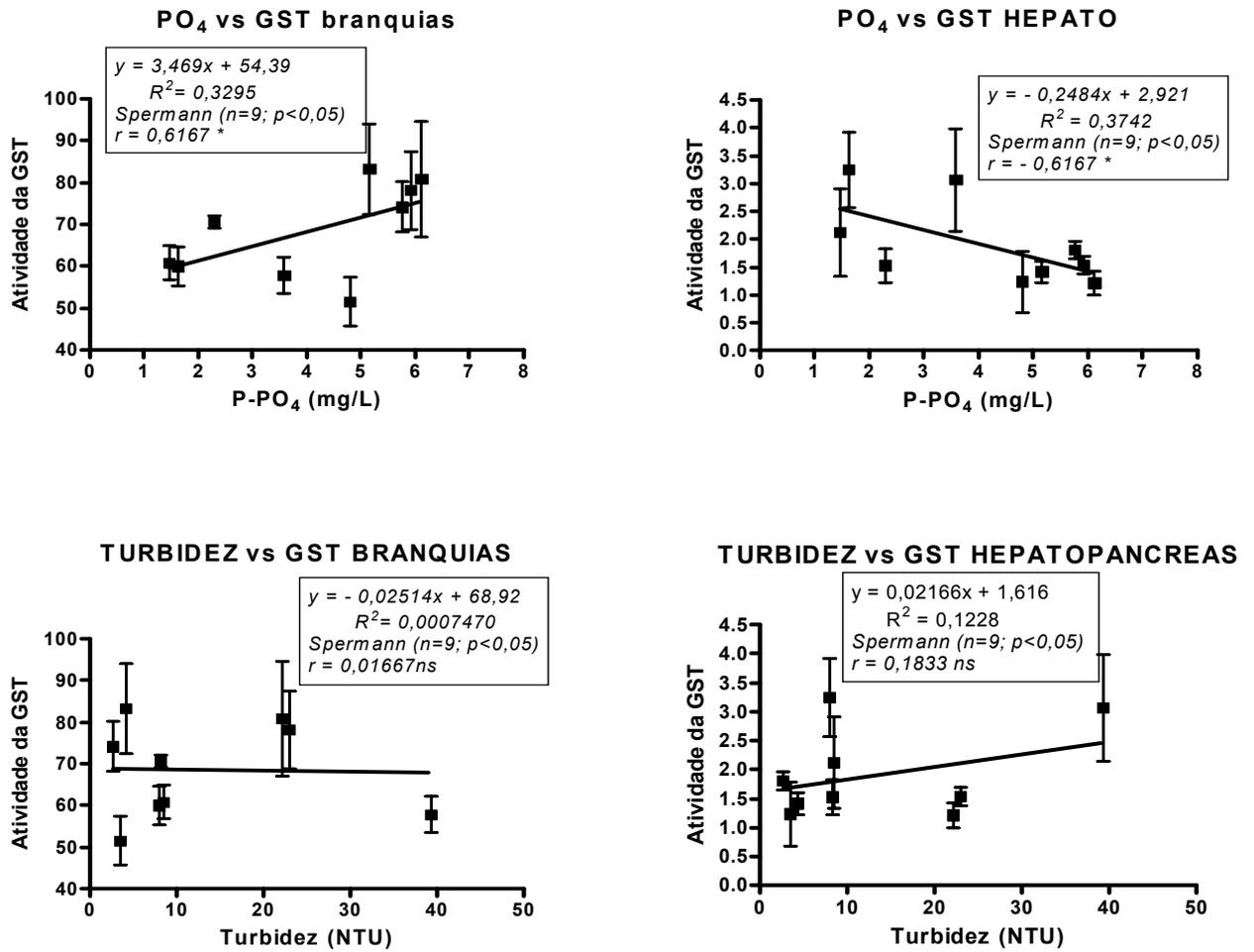


Figura 12 Co-relações de Fosfato e Turbidez com a atividade da GSTtotal em brânquias e hepatopâncreas, segundo o teste de Spermann.

* indica significância ($p < 0,05$); ns indica ausência de significância ($p > 0,05$).

4.3.3.2 Capacidade antioxidante da hemolinfa

A capacidade antioxidante total da hemolinfa dos camarões não apresentou diferença significativa entre o momento da transferência (t0) para os tanques de tratamento e ao final do período de aclimação (t1).

Por outro lado, foi observada diferença significativa entre a capacidade antioxidante observada em t0 e t1 e aquelas determinadas ao final (t2) de todos os três tratamentos. No entanto, não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 5).

A capacidade antioxidante total da hemolinfa mostrou uma relação direta com a concentração de proteínas totais presentes, sendo esta correlação significativa, (Sperman, $r = 0,7521$, $p < 0,0001$).

4.3.3.3 Proteínas totais

Os resultados da dosagem de proteínas totais nas brânquias e no hepatopâncreas, não indicaram diferenças significativas entre a transferência (t0), o período de aclimação (t1) e os diferentes tratamentos (t2) (Tabela 5).

Conforme mostrado na Tabela 5, não houve diferenças significativas na dosagem de proteínas totais na hemolinfa entre os diferentes tratamentos. Como esperado, a comparação das proteínas totais na hemolinfa não indicou qualquer diferença entre os valores de t0 e t1. No entanto, foi observada diferença significativa entre as determinações de proteínas totais da hemolinfa dos animais em t0 e àquelas determinadas nos animais ao término dos diferentes tratamentos. Entre os tratamentos, o sistema de troca-zero com recirculação e o sistema com troca diária (10%) mostraram diferenças significativas neste parâmetro bioquímico, quando comparados com o final da aclimação (t1).

Tabela 5: Proteínas totais nas brânquias, no hepatopâncreas e na hemolinfa e capacidade antioxidante total da hemolinfa.

Tratamento		Proteínas nas	Proteínas no	Proteínas na	Capacidade
		Brânquias (ug/mL)	Hepatopâncreas (ug/mL)	Hemolinfa (ug/mL)	Antioxidante da Hemolinfa (%)
Transferência	(t0)	5,15 ± 1,67 a	10,20 ± 2,10 a	12,20 ± 15,46 a	139,6 ± 113,60 a
Aclimação	(t1)	5,35 ± 0,28 a	11,89 ± 1,67 a	16,59 ± 11,12 ab	164,5 ± 54,07 a
Troca 10%	(t2 10%)	4,84 ± 0,23 a	11,18 ± 0,70 a	42,91 ± 10,95 c	382,2 ± 64,45 b
Estático	(t2 estat.)	4,46 ± 1,10 a	12,05 ± 0,58 a	41,12 ± 13,84 bc	435,8 ± 154,00 b
Recirculação	(t2 recirc.)	4,56 ± 0,40 a	12,09 ± 1,71 a	42,04 ± 8,87 c	473,1 ± 109,80 b

Os valores de proteínas totais correspondem às médias (\pm desvio padrão, SD) e estão expressos em ug/mL. A capacidade antioxidante da hemolinfa está expressa em %. As diferenças estatísticas estão indicadas por letras.

4.4. DISCUSSÃO:

Nos sistemas de cultivo tradicionalmente empregados na carcinicultura, a manutenção da qualidade da água é obtida com a intensa renovação da mesma. Assim sendo, estima-se que para a produção de uma tonelada de camarão em viveiros de engorda, sejam necessárias de 39 a 199 mil toneladas de água (BORGHETTI *et al.*, 2003).

Normalmente, esta água, rica em nutrientes, é despejada sem tratamento prévio no ambiente natural, contribuindo para a degradação do ambiente adjacente às áreas de cultivo.

Por outro lado, além da preocupação em não converter uma estação de cultivo em mais um agente de contaminação ambiental (ARANA, 2004), deve-se também ter em mente a importância da qualidade da fonte de água utilizada no cultivo e, ainda, o papel desempenhado pela água como veículo de agentes contaminantes, como por exemplo, na transmissão de vírus ou de outros patógenos.

Principalmente com o advento de doenças de etiologia viral na carcinicultura, o controle da qualidade da água e o controle da entrada de material infectado para dentro dos viveiros, têm sido destacados entre as estratégias de controle da disseminação de doenças. Desta forma, o controle das doenças nos cultivos tem sido um dos agentes motivadores para o desenvolvimento continuado e para a aplicação de diversas tecnologias de cultivo que reduzam ou eliminem a introdução de água potencialmente contaminada para dentro das fazendas. Assim sendo, segundo WASIELISKY, Jr *et al.*, (2006), entre os sistemas de manejo de água, o sistema de produção em troca zero representa um fator importante para a biossegurança nas fazendas, além de trazer um impacto positivo sobre a forma de utilização da água em relação à descarga de nutrientes.

Apesar destas vantagens, a redução na taxa de renovação de água pode aumentar os problemas de qualidade de água nos cultivos, causando, por exemplo, alterações nos níveis de oxigênio dissolvido e acúmulo de compostos nitrogenados, como a amônia (POLI & ARANA, 2004).

Assim sendo, o monitoramento dos parâmetros de qualidade de água nos diferentes sistemas de manejo de água nos cultivos, associado à análise de índices biométricos, pode fornecer uma melhor avaliação destas alternativas para a produção de camarões. Paralelamente, a análise de biomarcadores nos animais mantidos sob estas diferentes condições de manejo de água pode contribuir para uma avaliação mais precisa do efeito destes sistemas alternativos sobre o metabolismo dos animais.

Dentro desta perspectiva, o presente estudo avaliou o comportamento de parâmetros de qualidade de água, dados biométricos e alguns biomarcadores bioquímicos em *Litopenaeus vannamei*, em um cultivo experimental de curta duração, utilizando diferentes condições de manejo de água.

Em relação ao pH, até o vigésimo dia do cultivo, não foi observada diferença entre os tratamentos. Para todos os tratamentos, os valores de pH mantiveram-se dentro dos intervalos

recomendáveis para esta espécie de peneídeo (faixa de pH entre 7,3 e 8,1) (ARANA, 2004; MOSER, 2005). No entanto, entre o vigésimo - primeiro e o vigésimo - sétimo dia do experimento, uma diminuição progressiva nos valores de pH foi registrada no tratamento estático, seguida de uma queda brusca até o final do experimento. Esta observação poderia estar associada a um acúmulo maior de matéria orgânica, pseudo-fezes e/ou, ainda, metabólitos orgânicos nos tanques submetidos ao tratamento estático no decorrer do experimento. Esta hipótese encontra subsídios nos dados de turbidez, uma vez que foi registrado um aumento constante deste parâmetro neste sistema, em comparação com os outros dois sistemas utilizados: sistema fechado com recirculação e sistema aberto com troca diária de 10%. A ausência de diferenças entre os valores de pH e turbidez nestes dois últimos sistemas mencionados pode ser consequência do sistema de calhas, montado junto ao primeiro, uma vez que foi observado um acúmulo de matéria orgânica no fundo das mesmas, ao longo do experimento. Desta forma, poder-se-ia sugerir que parte da matéria orgânica e particulada em suspensão destes tanques foi removida, contribuindo para minimizar a acidificação da água de cultivo. Apesar de não mensurada, esta remoção poderia ser considerada como sendo parcialmente equivalente àquela atingida no sistema de troca de água diária de 10%, em função dos valores semelhantes de turbidez e pH observados entre este sistema e aquele com recirculação.

A queda constante da amônia durante o experimento, associada ao aumento de nitrato e nitrito, sugere um possível deslocamento da amônia para estes outros compostos nitrogenados. O nível da amônia registrado ao final do cultivo experimental não mostrou diferença significativa entre os tratamentos, o que sugere que, independente do tratamento ou sistema de manejo de água utilizado, a amônia diminuiu ao longo do experimento.

Cabe salientar que os níveis de amônia total aos quais os animais estavam expostos, no cultivo berçário do LCM, antes do início do experimento (1,53 mg/l) eram superiores a 50 % dos valores maiores recomendáveis (1,00 mg/l) para o cultivo de *L.vannamei* (ARANA, 2004; MOSER, 2005). Já a partir da segunda semana do início do experimento, os valores registrados caíram dentro da faixa recomendada. Nos trabalhos realizados por McINTOCH *et.al* (2000), McINTOCH *et.al* (2001) e COHEN *et.al* (2005), os níveis da amônia nos cultivos de *L.vannamei* em sistema fechado e em sistema semi-fechado também caíram até praticamente zero ao final dos respectivos experimentos. Além disso, COHEN *et al.* (2005) sugerem um possível deslocamento da amônia para nitritos e nitratos em um sistema semi-fechado, associando-o à presença de bactérias nitrificantes do gênero Nitrosomona e Nitrobacter. De forma análoga, os resultados obtidos no presente estudo poderiam sugerir um processo semelhante. A caracterização microbiológica dos sistemas utilizados poderia fornecer subsídios para esta hipótese.

Por outro lado, os níveis baixos de nitrato registrados no início da primeira semana do experimento, bem como o aumento da concentração deste composto ao longo do experimento (ver figura 6c), associação ao aumento seguido de uma queda das concentrações de nitrito (ver figura 6d), e à diminuição constante das concentrações de amônia (ver figura 6b), reforça a possibilidade da transformação da amônia em nitrito pela ação de bactérias do gênero Nitrosomonas e a

transformação do nitrito para nitrato pela ação de bactérias do gênero *Nitrobacter* tenham ocorrido (VINATEA, 2004) (ver Formula 1) e (Figura 6).

Formula 1: Ação das bactérias nitrificantes sobre a amônia o nitrito e nitrato
Obtida de Vinatea (2004).

Amônia (NH₄) → Nitrosomonas → Nitrito (NO₂) → Nitrobacter → Nitrato (NO₃)

Como esperado, o sistema aberto com troca diária de 10%, no qual foram registrados valores finais de amônia baixos ou iguais a zero (0,0 mg/L), permitiu uma eliminação constante da amônia formada, a qual ocorreu ao longo do experimento, independente da quantidade de ração fornecida aos animais. Cabe lembrar que restos de ração não consumida, além de partículas de alimentos desintegradas e das fezes dos animais, constituem uma fonte importante na geração de amônia nos sistemas de cultivo (VINATEA, 2004).

Ainda em relação aos compostos nitrogenados, os valores de nitrito na água registrados nos diferentes tratamentos mostraram-se consideravelmente baixos, correspondendo a um centésimo dos valores descritos por YONG-CHIN LIN *et al.* (2003) para salinidades de 25 ‰.

A ausência de diferença significativa nos níveis de fosfato, durante o experimento, entre o sistema estático e o sistema com recirculação, parece indicar que o acúmulo deste elemento se deu de forma semelhante, independente do manejo de água utilizado, bem como de um eventual consumo dentro do próprio sistema. Já no sistema de troca diária de 10%, os níveis de fosfato na água foram mantidos sem alterações significativas ao longo do cultivo, sugerindo que, como esperado, esta condição de manejo possibilitou a diluição sistemática deste elemento na água e o equilíbrio com a fonte externa de fosfato, proveniente da ração fornecida diariamente.

A taxa de sobrevivência não mostrou diferença estatística, tendo sido igual a 100% nos três tratamentos. Estudos realizados por McINTOCH (2000; 2001) e COHEN *et al.* (2005), registraram sobrevivências superiores a 90% em cultivos experimentais, realizados em sistemas semi-fechado e fechado. Esta pequena diferença pode estar relacionada à duração dos cultivos experimentais, os quais, diferentemente do presente estudo, foram mantidos por 50 e 94 dias, respectivamente. O crescimento dos camarões no cultivo experimental de trinta dias não apresentou diferença significativa entre os três tratamentos, tendo sido registrado um ganho de peso de 80 g/m², equivalente a um ganho médio por camarão de 2,7g no período do experimento ou de 0,67 g por semana. De modo semelhante, a conversão alimentar, nas condições do experimento, não se mostrou significativamente diferente entre os tratamentos, sendo comparável aos valores registrados por McINTOCH (2000; 2001) em cultivos de 50 dias.

A capacidade antioxidante total da hemolinfa dos espécimes de *Litopenaeus vannamei*, quantificada pelo método de inibição da oxidação da desoxirribose induzida pelo ferro, não

apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ao término do experimento. Entretanto, foi observada diferença estatística entre os tratamentos e a transferência e o período de aclimação.

A capacidade antioxidante total da hemolinfa parece estar diretamente relacionada com a concentração das proteínas totais presentes na hemolinfa, conforme evidenciado pela análise de correlação de Spearman ($r = 0,7521$). CHENG *et al.* (2002), demonstraram que a concentração de proteínas totais na hemolinfa do camarão *L. vannamei* está diretamente relacionada com o tamanho dos animais, sendo mais elevada quanto maior o animal. Assim, poder-se-ia sugerir que a menor capacidade antioxidante da hemolinfa determinada nos animais no início do experimento esteja relacionada à menor concentração de proteínas, consequência do tamanho menor dos mesmos no momento daquela coleta. Apesar da escassez de informações sobre a capacidade antioxidante e as proteínas da hemolinfa de peneídeos, HOLMBLAD & SÖDERHALL (1999) destacam a importância das proteínas plasmáticas entre as ferramentas para prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), indutoras potenciais de estresse oxidativo e dano celular, destacando, como exemplo, a proteína ferritina no lagostim *Pacifastacus leniusculus*. Por outro lado, no estudo realizado por CHEN & CHEN (2000) com *Penaeus monodon*, níveis elevados de amônia, uréia e aminoácidos livres na hemolinfa foram associados a um papel osmoregulador frente ao estresse.

O fato de não ter sido observada diferença significativa na atividade da enzima Glutathione-S-Transferase (GST), tanto nas brânquias quanto no hepatopâncreas nos diferentes tratamentos, pode-se refletir a ausência de efeitos mensuráveis provocados pelo conjunto de parâmetros de qualidade de água em cada tratamento. Como mencionado acima, os parâmetros de qualidade de água avaliados no presente estudo foram considerados como sendo compatíveis com a faixa de valores médios recomendados para o cultivo de camarões.

Entretanto, considerando-se a atividade da GST nos diversos tanques, independentemente dos tratamentos, e os parâmetros de qualidade de água, pode ser observada uma aparente correlação com os níveis de fosfato.

A comparação da atividade da GST total mostrou diferenças entre os níveis de atividade nas brânquias e no hepatopâncreas, sendo mais elevados no tecido branquial. Esta diferença pode estar refletindo diferenças no papel exercido por estes órgãos, considerando tanto a interação direta com o ambiente, como as vias de biotransformação de produtos endógenos e de contaminantes. As brânquias estão em contato direto com o meio aquático, constituindo o primeiro alvo de exposição a contaminantes e têm, ainda, um papel fundamental na osmoregulação e na eliminação de metabólitos orgânicos e produtos derivados de xenobióticos. Assim sendo, as células branquiais podem estar sujeitas a um maior estresse oxidativo e devem ter uma maior eficiência na excreção de produtos oriundos das vias de biotransformação. No entanto, a existência de padrões tecido-específicos relacionados à ocorrência de isoformas da GST nesta e em outras espécies de peneídeos não pode ser descartada. Além disso, possíveis variações tecido-específicas na concentração endógena do substrato desta enzima, a glutathione reduzida (GSH), e/ou variações na atividade de outras enzimas relacionadas com este tripeptídeo também devem ser consideradas.

Apesar da atividade da GST ser amplamente utilizada como biomarcador de exposição, a ausência de informações a respeito desta enzima de conjugação em crustáceos peneídeos deve ser destacada. Um trabalho recente com *Litopenaeus vannamei* (MOSER, 2005), avaliou a atividade da GST em animais expostos ao inseticida carbamato Carbofuran. Apesar de não ter sido observada diferença estatística entre os níveis desta enzima nas brânquias dos animais do grupo exposto e aqueles do grupo não-exposto (grupo controle), este resultado foi atribuído à dose e o tempo de exposição. Por outro lado, em função da diminuição da atividade da GST no hepatopâncreas dos animais expostos, foi sugerida uma possível inibição da enzima frente ao composto. De fato, a GST pode ser tanto ativada quanto inibida na presença de contaminantes, o que torna, muitas vezes, a atividade desta enzima um parâmetro complexo a ser avaliado (VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Quanto à comparação dos níveis de atividade da GST total nas brânquias e no hepatopâncreas, resultado semelhante quanto aos níveis desta enzima entre estes dois tecidos foi também relatado nos estudos de LUCHMANN (2005) com o peneídeo *Farfantepenaeus brasiliensis*, analisando espécimes coletados na Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. Independente do sexo dos espécimes, da estação do ano e da área do ambiente lagunar onde os animais foram expostos *in situ*, a atividade da GST nas brânquias foi aproximadamente duas vezes maior em comparação àquela detectada no hepatopâncreas.

A atividade da GST em peneídeos não tem sido investigada em relação a diferentes parâmetros de qualidade de água, nem tampouco comparada em diferentes sistemas de cultivo. Neste sentido, o presente trabalho representa uma investigação que amplia a utilização de biomarcadores em *L. vannamei*, visando o monitoramento do estresse causado por diferentes condições de manejo. No entanto, deve ser salientado que os dados obtidos sugerem a avaliação desta enzima em um cultivo experimental mais longo, superior aos trinta dias utilizados no presente estudo. Além disso, a análise conjunta de outros biomarcadores, como realizada em trabalhos recentes (WANG *et al.*, 2006; VIJAYAVEL & BALASUBRAMANIAN, *in press*; FIGUEIREDO *et al.*, *in press*), permitiria estabelecer de forma mais clara qual destes sistemas de manejo de água apresenta maior potencial como agente causador de estresse nos camarões e, em que medida esta estratégia bioquímica poderia ter um caráter preventivo precoce na detecção desta condição. Assim, poder-se-ia avaliar de forma global os benefícios das técnicas de manejo de água, visando a sustentabilidade da atividade, bons índices de produção e produtividade, além de minimizar a susceptibilidade dos animais às doenças.

4.5. CONCLUSÃO:

Os sistemas de manejo do cultivo de peneídeos, troca zero, troca zero com recirculação e troca diária 10%, mostraram diferenças ao longo do período do experimento (30 dias) em relação a alguns parâmetros de qualidade de água, como o pH, a concentração de nitrito, nitrato, fosfato e a turbidez.

No entanto, estes parâmetros de qualidade água mantiveram-se dentro dos parâmetros considerados como adequados para o cultivo de Litopenaeus vannamei, e, aparentemente, não chegaram a ser suficientemente diferentes para produzir efeitos mesuráveis nos índices de produção, nem tampouco, nos biomarcadores moleculares avaliados durante este experimento.

Sugere-se realizar este experimento considerando um tempo maior de cultivo (superior a 30 dias) e/ou ainda densidades de cultivo mais altas, a fim de gerar diferenças nos parâmetros de qualidade de água, suficientemente amplas, para produzir efeitos mesuráveis sobre os índices de produção e sobre os biomarcadores moleculares estudados. Sugere-se, ainda, a análise conjunta de outros biomarcadores moleculares, particularmente as enzimas associadas ao estresse oxidativo.

4.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO – ABCC (2003), **Censo da carcinicultura nacional 2003**, Disponível em: < <http://www.abccam.com.br/> >, Acesso 13 Abr. 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO – ABCC (2004), **Censo da carcinicultura nacional 2004**, Disponível em: < <http://www.abccam.com.br/> >, Acesso 13 Abr. 2006.
- ALVES, S.R. **Respostas Bioquímicas Em Tilapia No Rio Do Braço, Joinville, Sc.** 2003. 64 f. Dissertação (Dissertação Pos-Graduação em Biotecnologia), Centro de ciências Biológicas, departamento de Biotecnologia, Universidade federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- BHAVAN, OS; GERALDINE, P., 2001. Biochemical Stress Response In Tissues Of The Prawn *Macrobrachium malcolmsoni* On Exposure To Endosulfan. **Pestic. Physiol.** v.70, n. 1, p. 27-41. Mai. 2001
- BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. **Aquicultura – Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo.** Curitiba. Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais. 2003
- BURFORD M.A. et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 525-537. Abr. 2004
- CHEUNG, C. C. C. et al. Relationship Between Tissue Concentration Of Chlorinated Hydrocarbons And Antioxidant Responses Of Marine Mussels (*Perna Viridis*). **Mar Pollut Bull** v. 45, n. 1-12, p. 181-191. Set. 2003.
- CHEN, J.M; CHEN, J.C., Study on the free amino acid levels in the hemolymph, gill, hepatopancreas and muscle of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient ammonia. **Aquatic Toxicology** v. 50, n. 1-2, p. 27-37. Ago. 2000.
- FIGUEIREDO, F, A. et al. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. **Pest. Biochem . Physiol.** v. 85, n. 2, p. 97-103. Jun. 2006
- FITZPATRICK, P.J. et al. Assesment of A Glutathione-S-Transferase And Related Proteins In The Gill And Digestive Gland Of *Mytillus Edulis* (L.) As Potential Organic Pollution Biomarker. **Biomarkers**. v. 2, p. 51-56. 1997.
- GOWLAND, BTG. et al. Cypermethrin Induces Glutathione S Transferase Activity In The Shore Crab *Carcinus Maenas*. **Mar Environ Res**. v. 54, n. 2, p. 169-177. Ago. 2002.
- GUTTERIDGE, J.M.C; QUILAN, G.J. Antioxidant Protection against Organic and Inorganic Oxygen Radicals By Normal Human Plasma: The Important Primary Role For Iron-Binding And Iron-Oxidizing Proteins. **Bioch. Biophys. Acta** v. 1156, n. 2, p. 144-150. Feb. 1993.
- HOLMBLAD, P.H; SÓDERHALL, K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in crustacean, possible role in immunity. **Aquaculture** v. 172, n. 1-2, p. 111-123. Mar. 1999.
- INTITULO CEPA/SC. Instituto de planejamento e economia agrícola de Santa Catarina, Secretaria de Estado do desenvolvimento rural e agrícola. **Síntese anual da agricultura em Santa Catarina 200-2001**. Florianópolis 2001, p 248.
- JONES, A.B., DENNISON, W.C. & PRESTON, N.P., Improvements in water quality of aquaculture effluent after treatment by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption. In: **The World Aquaculture Society Conference**, Sydney. Australia 1999 Disponível em: <<http://ian.umces.edu/adrian/was99presentation.ppt>> Acesso 27 Jan. 2006
- KAUTSKY, N; et al.. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture** v. 191, n. 1-3, p.145-161, Nov. 2000.

- KEEN JH, HABIG, WH, JAKOY. WB. Mechanism for several activities of Glutathione-S-transferases. **Journal Biological Chemistry**. v. 251, p. 6183-6188. 1976.
- LACERDA L.D, et al. Relative importance of nitrogen and phosphorus emissions from shrimp farming and other anthropogenic sources for six estuaries along the NE Brazilian coast. **Aquaculture**. v. 253, n. 1-4, p. 433-446. Mar. 2006.
- LIN, Y.CH. E CHEN, J.CH.. Acute Toxicity Of Nitrite On *Litopenaeus vannamei* (Boone) Juveniles At Different Salinity Levels. **Aquaculture** v. 224, n. 1-4, p. 193-201. Jun. 2003
- LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 143, n. 1, p. 36-41. Mai. 2006.
- MANDUZIO, H; et al. Seasonal variation of antioxidant defenses in blue mussels, *Mytilus edulis*, collected from a polluted area: major contribution in gills of an inducible isoform of Cu-Zn-superoxide dismutase and of glutathione-S-transferase. **Aquatic Toxicol**. v. 70, n. 1, p. 83-93. Oct. 2004.
- MAYER,F.L. et al. Physiological And Non-Specific Biomarkers In: Huggett RJ; Kimerle, RA; Mehrle,Jr, P M.; Bergman H L; (Eds.) Biomarkers: Biochemical, Physiological And Histological Markers Of Anthropogenic Stress. **Lewis Publs**. Boca Raton, Florida, p. 5-85. 1992.
- MENASVETA, P. 2002. Improved Shrimp Growout Systems for Disease Prevention and Environmental Sustainability. in Asia. **J of Fisheries Science** v. 10, n. 3-4, p 391-402. Set. 2002.
- MOSER,J.R. **Respostas bioquímicas do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), axposto ao inseticida Carbofuran e detreminação da prevalência natural do vírus da necrose Hipodermal e Hematopoiética Infeciosa – IHHNV**. 2005. 69 f. Dissertação (Dissertação Pós-Graduação em Biotecnologia), Centro de ciências Biológicas, departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- O'DONOHUE, M.J., et al.. Ecological Impact of Nutrients from Shrimp Farms. Apresentado em: **The World Aquaculture Society Conference**, Sydney. 1999
- OLIVEIRA, UO. et al.. Effects of Environmental Anoxia And Different Periods Of Reoxygenation On Oxidative Balance In Gills Of The Estuarine Crab (*Chasmagnathus granulata*). **Comp Biochem Physiol**. v. 140, n.1, p. 51-57. Jan. 2005
- PASCUAL C. et al. Effect of size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels, **Aquaculture**. v. 230, n. 1-4, p. 405-416. Feb. 2004.
- PERAZZOLO L.M. et al. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress, **Aquaculture**. v. 214, n. 1-4, p. 19-33. Nov. 2002.
- PEREZ L. et al. Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. **Aquaculture**. v. 252, n. 2-4, p. 591-597. Mar. 2006.
- PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal. Biochem**. v. 83, n. 2, p. 346-356. Dec. 1977.
- POLI, C. R., VINATEA ARANA, L. Qualidade de água em aquicultura. In: POLI, Carlos Rogerio. et al (Org.) **Aquicultura. Experiências Brasileiras**. UFSC. 2004. p.53.
- SÁNCHEZ, A. et al. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation, **Aquaculture**. v. 198, n. 1-2, p. 13-28. Jun. 2001.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J. VERMULEN, E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment – A review. **Environ. Toxicol. and Pharmacol**. v. 13, n. 2, p. 57-149. Feb. 2003.

VENTURA E.C. et al. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis rubber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research**. v. 54, n. 3-5, p. 775-779, 2002.

VIJAYAVEL, K. ; BALASUBRAMANIAN, M. P. Fluctuations of biochemical constituents and marker enzymes as a consequence of naphthalene toxicity in the edible estuarine crab *Scylla serrata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 63, n. 1, p. 141-146. Jan. 2006

VINAGRE, T.M. et al. Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab, *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 135 C, n.1, p. 67-75, 2003.

VINATEA ARANA. **Princípios Químicos de Qualidade da água em Aquicultura**, 2. Ed. Florianópolis, Editora da UFSC, 2004, p 67-112.

WANG, W-N; WANG, Y.; WANG, A-L. Effect of supplemental L-ascorbyl-2-polyphosphate in enriched live food on the immune response of *Penaeus vannamei* exposed to ammonia-N. **Aquaculture**. v. 256, n. 1-4, p. 552-557, 2006.

WASIELISKY, JR, W. et al. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei* **Aquaculture**. n. 258, p 396-403. 2003.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO :

- ALVES, S.R. **Respostas bioquímicas em tilapia no rio do braço, Joinville, SC**. 2003. 64 f. . Dissertação (Dissertação Pos-Graduação em Biotecnologia), Centro de ciências Biológicas, departamento de Biotecnologia, Universidade federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- ANDREATTA, E. R.; BELTRAME, E. Cultivo de camarões marinhos. In: POLI, Carlos Rogerio. et al (Org). **Aquicultura Experiências Brasileiras**. UFSC, Florianópolis, 2004. p.199 - 220
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO – ABCC (2004), **Censo da carcinicultura nacional 2004**, Disponível em: (<http://www.abccam.com.br/>), Acesso 13 Abr. 2006.
- BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R. **Aquicultura. Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba. 2003. p.128.
- BURFORD M.A. et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 525-537. Abril 2004.
- COHEN, J.M. et al. Characterization of water quality factors during intensive raceway production of juvenile *Litopenaeus vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. **Aquacultural Engineering**, v. 32, n. 3-4, p. 425-442. Abril 2005
- DA SILVA, A.Z. **Avaliação de Biomarcadores Bioquímicos na ostra – do – mangue (*Crassostrea rhizophorae*) (MOLLUSCA: BIVALVIA) exposta a óleo diesel, em diferentes salinidades**. 2004 69f. Dissertação (Dissertação Pos-Graduação em Biotecnologia), Centro de ciências Biológicas, departamento de Biotecnologia, Universidade federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- FROTA, I. L. N., **Análise dos determinantes da vantagem competitiva da carcinicultura nordestina 2005**. 112 f. Dissertação (Dissertação Pos-Graduação em Administração). Centro de Ciências Sociais Aplicadas , Departamento de Ciências Administrativas, Universidade, Federal de Pernambuco, Recife, 2005.
- HOPKINS, R.D. HAMILTON, II, P.A. SANDIFER, C.L. BROWDY AND A.D. STOKES , Effect of water exchange rate on production, water quality, effluent characteristics and nitrogen budgets of intensive shrimp ponds. **J. World Aquaculture Soc.** v. 24, n. 3, p.304–320. Set. 1993.
- JIANN-CHU CHEN ; FAN-HUA NAM, Effect of ambient ammonia on ammonia-N excretion and ATPase activity of *Penaeus chinensis*, **Aquatic Toxicology**, v. 23, n. 1, p.1-10. Jul. 1992
- JONES, A.B., DENNISON, W.C; PRESTON, N.P.,. Improvements in water quality of aquaculture effluent after treatment by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption. In: **The World Aquaculture Society Conference**, Sydney. Australia1999 Disponível em: <<http://ian.umces.edu/adrian/was99presentation.ppt>> Acesso 27 Jan. 2006
- KAUTSKY , N; et al.. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture** v. 191, n. 1-3, p.145-161, Nov. 2000.
- LACERDA L.D, et al. “Relative importance of nitrogen and phosphorus emissions from shrimp farming and other anthropogenic sources for six estuaries along the NE Brazilian coast. **Aquaculture**. v. 253, n. 1-4, p. 433-446. Mar. 2006.
- LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 121-131. Nov. 2000.
- LUCHMANN, K.H. **Avaliação de biomarcadores bioquímicos em camarão-rosa *Farfantopenaeus paulensis* e *Farfantopenaeus brasiliensis* coletados na lagoa da conceição, ilha de Santa Catarina/SC-Brasil**. Dissertação (Dissertação Pos-Graduação em Biotecnologia), Centro de ciências Biológicas, departamento de Biotecnologia, Universidade federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

- MACIEL, M.L.T. **Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária de cultivos de camarão marinho no Estado de Santa Catarina**. Dissertação de Mestrado. Programa de PG em Aqüicultura. UFSC, Florianópolis. p. 62, 2002.
- MARQUES, M.R.F. BARRACCO, M.A. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 23-44, Nov. 2000.
- MENASVETA, P. 2002. Improved Shrimp Growout Systems for Disease Prevention and Environmental Sustainability. in Asia. **J of Fisheries Science** v. 10, n. 3-4, p 391-402. Set. 2002.
- MOSER, J.R. **Respostas bioquímicas do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), axposto ao inseticida Carbofuran e detreminação da prevalência natural do vírus da necrose Hipodermal e Hematopoiética Infeciosa – IHHNV**. 2005 69 f. Dissertação (Dissertação Pós-Graduação em Biotecnologia), Centro de ciências Biológicas, departamento de Biotecnologia, Universidade federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- McINTOSH D. et al. The effect of a commercial bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with a low-protein diet in an outdoor tank system and no water exchange. **Aquacultural Engineering**, v. 21, n. 3, p 215-227. Jan. 2000.
- McINTOSH, D. et al. Effects of two commercially available low-protein diets (21% and 31%) on water and sediment quality, and on the production of *Litopenaeus vannamei* in an outdoor tank system with limited water discharge. **Aquacultural Engineering**, v. 25, n. 2, p 69-82. Set. 2001.
- MOHANKUMAR, K.E.P. RAMASAM, Y. P. White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. **Virus Research**, v. 115, n. 1, p 69-75. Jan. 2006.
- NIYOGI, S.; SARKER, S.; DATTA, A. G. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. **Mar. Environ. Res.** v. 52, p. 13-26, 2001.
- O'DONOHUE, M.J., et al.. Ecological Impact of Nutrients from Shrimp Farms. Apresentado em: the World Aquaculture Society Conference, Sydney. 1999
- PASCUAL C. et al. Effect of size-based selection program on blood metabolites and immune response of *Litopenaeus vannamei* juveniles fed different dietary carbohydrate levels, **Aquaculture**. v. 230, n. 1-4, p. 405-416. Feb. 2004.
- PERAZZOLO L.M. et al. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress, **Aquaculture**. v. 214, n. 1-4, p. 19-33. Nov. 2002.
- PEREZ L. et al. Changes in metabolic and immunological variables of wild and pond-reared southern white shrimp *Litopenaeus schmitti* adult males during continuous reproductive activity. **Aquaculture**. v. 252, n. 2-4, p. 591-597. Mar. 2006.
- POLI, C. R., VINATEA ARANA, L. Qualidade de água em aqüicultura. In: POLI, Carlos Rogerio. et al (Org.) **Aquicultura. Experiências Brasileiras**. UFSC. 2004. p.53.
- SEIFFERT, W.Q. A mancha branca em Santa Catarina. **Panorama da Aqüicultura**, v.87, p. 51-53, 2005.
- STEGEMAN, J. J.; BROWER, M.; DI GIULO, R. T.; FORLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: **Biomarkers, biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Huggett, R. J.; Kimerle, R. A.; Mehrle Jr. P. P & Bergman, H. L. Eds. Lewis Publ. p 235-335, 1992.
- REDÓN, L. & BALCÁZAR, J. L. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. **Revista Aquatica**, v. 19, p 27-33. 2003

- SÁNCHEZ, A. et al. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation, **Aquaculture**. v. 198, n. 1-2, p. 13–28. Jun. 2001.
- VENTURA E.C. et al. Biochemical indicators of contaminant exposure in spotted pigfish (*Orthopristis ruber*) caught at three bays of Rio de Janeiro coast. **Marine Environmental Research**. v. 54, n. 3-5, p. 775-779. Set/Dec. 2002.
- VENTURA E.C. **Biomarcadores Bioquímicos em *Orthopristis ruber* (Cuvier 1830) e *Micropogonias furneri* (Desmarest, 1823), coletadas na costa sudeste brasileira**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. UFSC. Florianópolis, SC, 2004.
- VINATEA ARANA . **Princípios Químicos de Qualidade da água em Aquicultura**, 2. Ed. Florianópolis, Editora da UFSC, 2004, p 67-112.
- WALKER, C. H. et al. **Principles of ecotoxicology**. London: Taylor & Francis, 1996.
- WANG, A. L. et al. Effect of dietary vitamin C supplementation on the oxygen consumption ammonia-N excretion and Na⁺-K⁺ ATPase of *Macrobrachium nipponense* exposed to ambient ammonia. **Aquaculture**. v. 220, n 1-4, p.833-841. Abr. 2003.
- WANG, A. L. et al. Effect of dietary vitamin C and ammonia concentration on the cellular defense response of *Macrobrachium nipponense*. **J. World Aquaculture Soc.**v. 36. n. 1, p. 1-7, Abr. 2005.
- WEI-NA WAN. et al. Effect of pH on survival, phosphorus concentration, adenilate energy charge Na⁺ - K⁺ ATPase activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles. **Aquatic Toxicology**, v. 60, n. 1-2, p 75 – 83, Out. 2002.