

## CARRAGENANAS DA RODOFÍCEA *Solieria filiformis* (KÜTZING) P. W. GABRIELSON: ANÁLISE POR DUAS METODOLOGIAS DE PRECIPITAÇÃO<sup>1</sup>

Grazielle da Costa PONTES\*; José Tarcísio Borges BEZERRA-NETO; José Ariévilto Gurgel RODRIGUES;  
Wladimir Ronald Lobo FARIAS

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará - UFC

\*e-mail: grazielle\_cp@hotmail.com

Recebido em: 21 de julho de 2008

**Resumo** - Os polissacarídeos sulfatados (PS) de algas marinhas têm sido estudados como fontes promissoras na prevenção e tratamento de doenças relacionadas à trombose. No entanto, o emprego de técnicas diferentes pode influenciar o rendimento final desses compostos. Avaliou-se a eficiência de duas metodologias de precipitação de PS da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* comparando-se o rendimento, o fracionamento e a atividade anticoagulante. Inicialmente, os PS totais foram extraídos com papaína bruta em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM, sendo realizadas três extrações consecutivas. Em seguida, os PS foram precipitados com uma solução de cloreto cetilpiridínio a 10% (M I) e álcool absoluto (M II). Os extratos foram analisados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose da qual foram parcialmente separadas frações através de um gradiente de NaCl. A atividade anticoagulante foi avaliada através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) utilizando-se plasma humano, sendo o tempo de coagulação registrado em um coagulômetro. Os resultados mostraram que tanto o rendimento como os perfis cromatográficos foram levemente semelhantes entre os métodos, mas denotando uma baixa eficiência de separação das frações de PS, quando eluídas em DEAE-celulose por gradiente salino. A espécie apresentou frações que modificaram o TTPA normal com atividades maiores nas primeiras quando comparadas às demais extrações em ambos os métodos, atingindo prolongamentos de, no máximo, 2,54 (M I) e 2,23 (M II) vezes em relação ao tempo controle, sendo estas atividades também dependentes da propriedade metacromática dos PS. Desta forma, a utilização de etanol apenas seria uma forma mais econômica de obtenção desses compostos em *S. filiformis* para a realização de outras atividades biológicas.

**Palavras-chave:** Alga vermelha, polissacarídeos sulfatados, coagulação.

### CARRAGEENANS FROM *Solieria filiformis* RHODOPHYCEAE (KÜTZING) P. W. GABRIELSON: ANALYSIS BY TWO PRECIPITATION METHODS

**Abstract** - Sulfated polysaccharides (SP) of seaweed have been the subject of studies as promising sources in the prevention and treatment of diseases related to thrombosis. However, the use of different techniques can influence the final yield of these compounds. The effectiveness of two precipitation methods was evaluated with SP extracted from the red marine alga *Solieria filiformis* comparing the yield, fractionation and anticoagulant activity. Initially, the total SP were extracted with crude papain in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA, and made three consecutive extractions. Then, the SP was precipitated by a 10% cetylpyridinium chloride solution (MI) and absolute alcohol (M II). The extracts were analyzed by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose column, which was separated partially fractions by a NaCl gradient. The anticoagulant activity was evaluated through the activated partial thromboplastin time (APTT) using human plasma, and the clotting time recorded in a coagulometer. The results showed that both the yield and the slightly chromatographic profiles were similar between methods, but denoting a low efficiency of separation of SP fractions when eluted on DEAE-cellulose by salt gradient. The species presented fractions that modified the normal APTT with major activities in the first when compared to other extractions in both methods, prolonging of up to 2.54 (MI) and 2.23 (M II) times its time control, and these activities also dependent of metachromatic property of SP. Thus, the use of ethanol would be the more economical procedure of obtaining these compounds in *S. filiformis* for the evaluation of other biological activities.

**Keywords:** Red alga, sulfated polysaccharides, coagulation.

<sup>1</sup> Trabalho realizado com apoio financeiro do CNPq

## INTRODUÇÃO

As algas são organismos fotossintetizantes encontradas nos mais diversos ambientes aquáticos, podendo assumir estilos de vida na forma de seres planctônicos e bentônicos (SZE, 1997), lançando mão de diversas estratégias reprodutivas de perpetuação de espécies e síntese de inúmeras classes de compostos bioativos os quais estão normalmente envolvidos nos processos metabólicos (responsáveis pelas mais diversas funções biológicas) comuns a todo ser vivo ou particulares de grupos taxonômicos específicos (TEIXEIRA, 2002).

A síntese de compostos conhecidos como polissacarídeos sulfatados (PS) têm despertado grande interesse na biotecnologia de produtos naturais com vistas as suas propriedades gelificantes, espessantes e estabilizantes de misturas aquosas e emulsões na indústria de alimentos (GLICKSMAN, 1983), na bioprospecção de novos farmacológicos anticoagulantes (FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; ATHUKORALA et al., 2006; ATHUKORALA et al., 2007; FONSECA et al., 2008) e na prevenção do estresse no cultivo de peixes e camarões (FARIAS et al., 2004; RODRIGUES, 2006; RODRIGUES et al., 2008). Esses compostos estão na forma de fucanas nas algas marinhas pardas (Phaeophyceae), de galactanas nas algas vermelhas (Rhodophyceae) e, nas algas verdes (Chlorophyceae), os mais encontrados são as arabino-galactanas (PERCIVAL; MACDOWEL, 1967). Formas conhecidas como glicosaminoglicanos (condroitim sulfato, heparim sulfato, queratim sulfato, dermatim sulfato e heparina) se faz presente nos animais (KJELLÉN; LINDAHL, 1991).

Galactanas sulfatadas (conhecidas como carragenanas e agaranas) (PAINTER, 1983) são amplamente utilizadas na indústria alimentícia como possuidoras de propriedades gelificantes e espessantes (GLICKSMAN, 1983) e algumas delas têm revelado como promissores agentes anticoagulantes e antitrombóticos na terapia de pacientes acometidos com hemofília (FONSECA et al., 2008), as quais levam, na grande maioria dos casos, a óbitos ou à invalidez parcial ou total, causando graves repercussões para o paciente, sua família e a sociedade promovidas pelo sedentarismo, hábitos alimentares e o estresse (NADER et al., 2001). Seu estudo também é justificado em razão dos efeitos colaterais do uso terapêutico da heparina em pacientes com estado de hipercoagulapatia ou sujeitos à trombose causada por diferentes etiologias (WEIZT, 1994), motivando assim pesquisas envolvendo uma grande variedade de organismos marinhos na perspectiva de substitutos para a heparina (MOURÃO; PEREIRA, 1999).

O emprego de diferentes solventes, por outro lado, pode influenciar a obtenção desses compostos (RODRIGUES; FARIAS, 2005) em razão da grande variação estrutural dos PS entre diferentes espécies de algas marinhas, justificada pela grande heterogeneidade e complexidade desses

compostos (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967; FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; ZHANG et al., 2008). Tais diferenças entre espécies também podem influenciar, por exemplo, a atividade anticoagulante (HAROUN-BOUHEDJA et al., 2000) e a obtenção de distintos compostos quando empregadas diferentes metodologias de extração (VILLANUEVA; PAGBA; MONTANO, 1997) e agentes precipitantes de PS (RODRIGUES; FARIAS, 2005).

A atividade anticoagulante é uma das propriedades biológicas mais investigadas de PS de algas marinhas. Galactanas sulfatadas isoladas das rodofíceas *Botryocladia occidentalis* (Farias et al., 2000) e *Gelidium crinale* (PEREIRA et al., 2005) apresentaram potentes atividades anticoagulantes comparadas à heparina. Pushpamali et al. (2008) isolaram uma galactana sulfatada da alga vermelha *Lomentaria catenata* extraída por fermentação com atividade anticoagulante superior a heparina. Um heparinóide obtido por extração aquosa da clorofícea *Monostroma latissimum* (ZHANG et al., 2008) exibiu um efeito inativador no tempo normal de coagulação.

De forma a contribuir com a bioprospecção de novos agentes anticoagulantes, PS da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* foram avaliados quanto ao seu potencial anticoagulante a partir da utilização de duas metodologias de precipitação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### COLETA E TRATAMENTO PRELIMINAR DA ALGA MARINHA *S. filiformis*

Exemplares da alga marinha vermelha *S. filiformis* (Solieriaceae) foram coletados na Praia do Pacheco – Ceará, armazenadas em sacos plásticos e conduzidos ao Laboratório de Bioquímica Marinha da Universidade Federal do Ceará do Departamento de Engenharia de Pesca. Em laboratório, o material foi lavado com água destilada para a total retirada do sal, areia e organismos incrustantes e/ou epífitas. Em seguida, a alga foi seca ao sol e cortada em pequenos pedaços para extração dos PS totais.

### EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Metodologias semelhantes de obtenção foram utilizadas, diferindo apenas quanto ao uso do agente precipitante de PS.

MÉTODO I - Os PS totais (M I) foram obtidos de acordo com Farias et al. (2000). Inicialmente, 2 gramas da alga seca foram hidratadas com 100 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo EDTA 5mM e cisteína 5mM (AcNa). Em seguida, foram adicionados 6,8 mL de solução de papaína bruta (30 mg mL<sup>-1</sup>), sendo a mistura incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após esse período, o material foi filtrado (60 µm), centrifugado (7.965 × g; 4°C) e, ao sobrenadante, foram

adicionados 6,4 mL de cloreto cetilpiridínio (CPC) a 10% para a precipitação dos polissacarídeos presentes na mistura por, no mínimo, 24 horas à temperatura ambiente. Logo após a precipitação, o precipitado foi lavado com 200 mL de CPC 0,05% sendo, em seguida, dissolvido em 70 mL de cloreto de sódio 2 M:etanol absoluto (100: 15; v/v) e submetido a uma nova precipitação por, no mínimo, 24 horas a 4°C, através da adição de mais 122 mL de etanol absoluto. Posteriormente o material foi centrifugado e submetido a duas lavagens com 200 mL de etanol a 80% e uma com 120 mL de etanol absoluto. Após esta etapa, o material foi então levado à estufa a 60°C, por um período aproximado de 24 horas para secagem e obtenção do extrato bruto.

MÉTODO II - Os PS totais (M II) foram obtidos segundo Farias et al. (2000) seguido por Bezerra-Neto et al. (2008). Inicialmente, 2 g da alga seca e triturada foram hidratados com 100 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5mM (AcNa). Em seguida, foram adicionados 6,8 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg mL<sup>-1</sup>), sendo a mistura incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após a incubação, o material foi filtrado (60 µm), centrifugado e, ao sobrenadante, acrescentados três volumes de etanol absoluto gelado para precipitação dos PS (48 h) em freezer. Em seguida, o material foi centrifugado e submetido a duas lavagens com 200 mL de etanol 80% e uma vez com 120 mL de etanol absoluto. Finalmente, o extrato foi seco em estufa (60°C; 24 h) para obtenção dos polissacarídeos totais.

Os resíduos obtidos de ambas as metodologias foram submetidos a novas extrações a fim de otimizar o rendimento segundo Bezerra-Neto et al. (2008).

#### FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATDOS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

Amostras dos extratos totais de PS obtidos de ambos os métodos foram dissolvidos em 1 mg mL<sup>-1</sup> em tampão de extração (AcNa) e aplicados em uma coluna de troca iônica DEAE-celulose (6,5 × 1,5 cm), equilibrada no mesmo tampão AcNa, acoplada a um coletor de frações (BEZERRA-NETO et al., 2008). A coluna foi eluída, passo a passo, com soluções de diferentes concentrações de NaCl (0,50; 0,70; 0,90; 1,20; 1,40 e 1,60 M) também preparadas no próprio tampão de equilíbrio. O fluxo da coluna foi de 60 mL h<sup>-1</sup>, sendo coletadas frações de 1 mL min<sup>-1</sup>. Os PS foram monitorados através da propriedade metacromática com 1,9-azul-dimetilmetileno (ADM) utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 525 nm (FARNDAL; BUTTLE; BARRETT, 1986).

## CARBOIDRATO TOTAL (CT) E CONDUTIVIDADE (CD) DAS FRAÇÕES

A presença de CT nas frações foi determinada pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956) e um condutivímetro (Analyser) foi utilizado para estimar a CD real das frações eluídas tomando-se como referência soluções padrões de NaCl nas concentrações de 0,5; 0,9 e 2,0 M de sais.

## ENSAIOS ANTICOAGULANTES

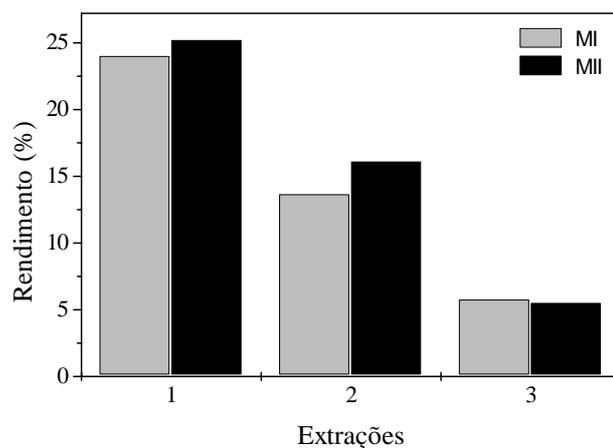
Os testes anticoagulantes (*in vitro*) foram realizados através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) segundo Anderson et al. (1976) utilizando plasma humano citratado obtido de cinco diferentes doadores. Primeiramente, o sangue foi centrifugado ( $73,75 \times g$ ; 15 min.) para a obtenção de um plasma pobre em plaquetas. Para a realização do teste, foram incubados a 37°C por 3 minutos, 50 µL de plasma humano, 50 µL de cefalina ativada (Celite Biolab) e 5 µL da fração de PS. Após a incubação, foram adicionados 50 µL de cloreto de cálcio 0,025 M à mistura para ativar a cascata de coagulação. Os testes foram realizados em duplicata, sendo o tempo de coagulação determinado automaticamente em um coagulômetro Drake, modelo Quick-timer.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### RENDIMENTO

O emprego da digestão enzimática de proteínas por enzimas proteolíticas (papaína) resultou em três extrações consecutivas de PS totais para cada método (M I e M II) (Figura 1). Os rendimentos foram levemente superiores no M II quando comparados ao M I, totalizando 46,8 e 43,4%, respectivamente. A maior diferença entre os métodos foi observada na 2ª extração (M II) enquanto rendimentos semelhantes (3ª extração) e decrescentes foram observados ao final do uso técnica em *S. filiformis*.

O emprego da técnica utilizando os respectivos métodos Rodrigues e Farias (2005) também observaram um decréscimo no rendimento durante a realização de quatro extrações (13 e 15,75% para M I e M II, respectivamente) de PS totais da clorócea *C. racemosa* enquanto rendimentos totais bem inferiores (7,1 e 8,1% para M I e M II, respectivamente) foram encontrados para *C. sertularioides* durante a realização de três extrações consecutivas (BEZERRA-NETO et al., 2008). Extrações enzimáticas consecutivas utilizando CPC (M I) na precipitação de PS totais das algas marinhas vermelhas *Champia feldmannii* (TORRES, 2005) e *Halymenia pseudofloresia* (RODRIGUES; FARIAS, 2008) apresentaram rendimentos totais bastante elevados (36,2 e 63,96%, respectivamente) quando também comparados a *S. filiformis* neste trabalho.



**Figura 1** – Rendimentos, por extração, dos extratos brutos obtidos dos M I e M II da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. A alga foi desidratada ao sol e triturada seguida de hidratação em tampão AcNa (pH 5,0) para posterior adição da protease cisteínica papaína na extração dos PS totais.

A realização de três extrações aquosas consecutivas em diferentes condições de temperatura (60 e 80°C) seguida por precipitação com etanol absoluto Amorim (2005) obteve rendimentos de frações solúveis de PS totais da alga marinha vermelha *Halymenia floresia* de 4; 20,6 e 14%, respectivamente. Os rendimentos obtidos pelos M I e M II de *S. filiformis* também demonstram o potencial das espécies rodofíceas na produção desses hidrocolóides.

A variação do rendimento no decorrer da técnica, por outro lado, tem sido observado quando empregado diferentes metodologias na precipitação desses compostos (M I e M II) quando extraídos por enzimas. Torres (2005) observou que, utilizando ambas as metodologias, o rendimento aumentou no decorrer do processo de otimização dos PS da alga marinha vermelha *C. feldmannii*. No entanto, o uso de etanol como agente precipitante (M II) resultou na melhor forma de obtenção desses compostos presentes na espécie. O emprego de diferentes metodologias de extração (VILLANUEVA; PAGBA; MONTANO, 1997), a variação sazonal e a utilização de diferentes espécies (LEVRING; HOPPE; SCHMID, 1969; BIRD, 1988), como a utilização de técnicas diferentes também podem influenciar no rendimento final de PS totais (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967).

#### FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

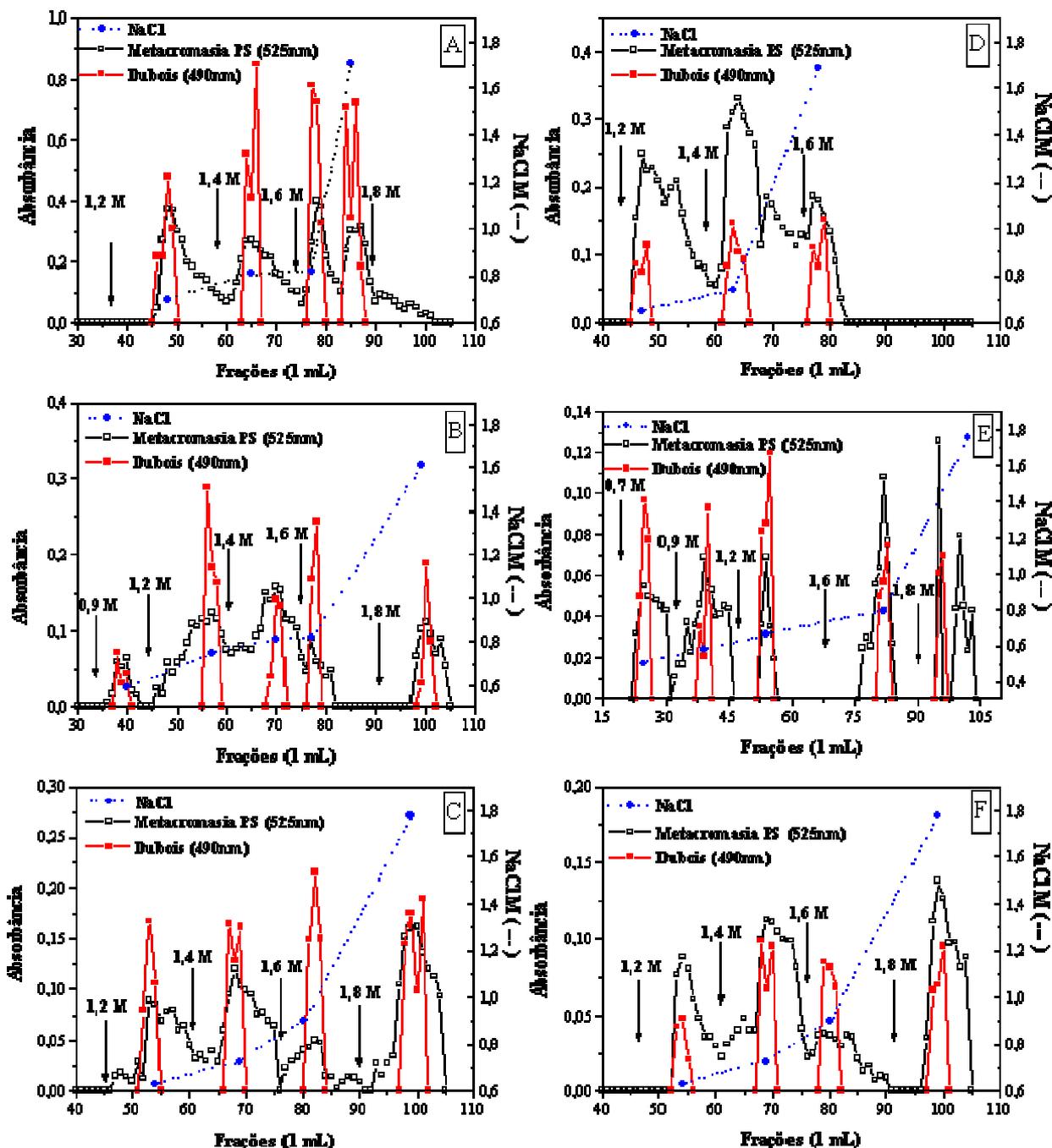
Os perfis cromatográficos obtidos durante o fracionamento dos PS totais em coluna de troca iônica DEAE-celulose indicaram, no geral, semelhanças entre os métodos como mostrado na Figura 2. A eficiência de separação, por outro lado, foi bem menor quando as frações de PS foram eluídas nas diferentes concentrações de NaCl. A 1ª extração (M I) mostrou uma parcial separação de quatro frações eluídas com 1,2; 1,4; 1,6 e 1,8 M de sais, das quais a 1,2 e 1,6 M apresentaram as maiores

metacromasias (Figura 2A) enquanto perfis comparativamente diferentes foram observados nas 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> extrações (Figuras 2B e 2C). Este comportamento praticamente se manteve em comparação ao M II, quando também diferenças numéricas e redução da intensidade metacromática das frações eluídas foram observadas no decorrer dos diferentes extratos de *S. filiformis* (Figura 2). Por outro lado, um maior padrão de separação foi observado no M II, principalmente na 2<sup>a</sup> extração, a qual também indicou um perfil de CT (Dubois) superior ao metacromático (Figura 2E), enquanto esta última característica esteve presente em todos os perfis cromatográficos do M I (Figuras 2A, 2B e 2C). A maior presença de polissacarídeos totais (Dubois) na maioria das frações de PS talvez seja justificada em razão da extração de polissacarídeos neutros, os quais podem interagir com a coluna DEAE-celulose (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967).

A coluna de troca iônica DEAE-celulose é comumente empregada na separação de frações de PS de algas marinhas (PEREIRA et al., 2005; RODRIGUES; FARIAS, 2005; BEZERRA-NETO et al., 2008). Rodrigues e Farias (2008) isolaram frações oriundas de três extrações consecutivas de PS totais da rodofíceia *H. pseudofloresia* e revelaram diferenças marcantes entre os perfis cromatográficos dos PS. Entretanto, a complexidade e heterogeneidade desses compostos nas diferentes espécies de algas marinhas se traduzem em dificuldades durante procedimentos de separação e purificação, tornando difícil a elucidação da estrutura química (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967; FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; ZHANG et al., 2008).

#### ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

Os ensaios anticoagulantes realizados segundo o teste do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), revelaram frações de PS que modificaram o tempo de coagulação (Tabela 1). Frações de PS oriundas das primeiras extrações em ambos os métodos apresentaram as maiores atividades anticoagulantes, quando prolongamentos de 2,54 e 2,23 vezes foram observados nas frações eluídas com 1,2 (M I) e 1,4 (M II) M de sais, respectivamente, superiores assim ao tempo controle, enquanto nas 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> extrações os polissacarídeos praticamente não modificaram o TTPA, prolongando, no máximo, em 1,52 vezes. A extração sequencial dos PS oriundos do mesmo resíduo tecidual de *S. filiformis* também resultou em atividades dependentes da propriedade metacromática (Figura 2 e Tabela 1), mostrando, de uma maneira geral, efeitos maiores em frações com elevadas metacromasias ou quando a dosagem de CT (Dubois) e metacromasia se fez semelhantes entre si (Figura 2).



**Figura 2** - Cromatografia em DEAE-celulose dos extratos totais obtidos pelos métodos I (A; B e C) e II (D; E e F) da rodofícea *S. filiformis*. A coluna foi equilibrada e lavada com tampão AcNa (pH 5,0). Os PS adsorvidos no gel foram eluídos com o tampão de AcNa contendo NaCl em diferentes concentrações (0,7; 0,9; 1,2; 1,4; 1,6 e 1,8 M). Os PS foram monitorados com azul-dimetilmetileno a 525 nm. (○—○) propriedade metacromática; (■—■) CT (Dubois) e (■—■) condutividade (NaCl).

**Tabela 1** - Atividade anticoagulante (TTPA) dos picos das frações obtidos no fracionamento dos polissacarídeos sulfatados (M I e M II) de *Solieria filiformis* em DEAE-celulose

Frações	1 <sup>a</sup> Extração				2 <sup>a</sup> Extração				3 <sup>a</sup> Extração			
	** TTPA		** TTPA		** TTPA		** TTPA		** TTPA		** TTPA	
NaCl (---)	M I	T <sub>1</sub> T <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	M II	T <sub>1</sub> T <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	M I	T <sub>1</sub> T <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	M II	T <sub>1</sub> T <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	M I	T <sub>1</sub> T <sub>0</sub> <sup>-1</sup>	M II	T <sub>1</sub> T <sub>0</sub> <sup>-1</sup>
1,2 M	97,7	2,54	71,5	1,86	41,3	1,07	44,5	1,15	40,6	1,05	44,2	1,15
1,4 M	78,3	2,04	85,7	2,23	48,9	1,27	*	*	45,0	1,17	47,0	1,22
1,6 M	82,2	2,14	78,25	2,04	46,0	1,20	50,7	1,32	40,8	1,06	44,0	1,14
1,8 M	74,7	1,94	*	*	58,4	1,52	52,3	1,36	47,5	1,23	44,2	1,15
Controle	38,4 s											

Resultados da média de duas determinações;

\*\* TTPA em segundos;

\* Sem atividade.

Os diferentes valores nos TTPAs das frações de PS eluídas em DEAE-celulose empregando-se CPC (M I) e álcool absoluto (M II) como agentes precipitantes Rodrigues e Farias (2005), Torres (2005) e Bezerra-Neto et al. (2008) também observaram alterações na atividade utilizando-se a digestão enzimática por enzimas proteolíticas na extração consecutiva de PS totais, já que poucas pesquisas relatam o emprego da técnica com proteases. A utilização de enzimas é considerada mais eficiente na extração de compostos bioativos presentes em algas na realização de ensaios biológicos, pois torna possível a solubilização de polissacarídeos naturalmente alocados em membranas e outros tecidos constituintes das algas. Além disso, o emprego de enzimas possui a propriedade de digerir ligações de materiais da parede celular das algas, embora com taxa de hidrólise dependente do tipo de ligação e comprimento da cadeia do polissacarídeo (HEO et al., 2003; ATHUKORALA et al., 2006).

Os efeitos colaterais do uso da heparina têm motivado a busca por novas fontes alternativas de compostos na prevenção e tratamento de doenças relacionadas à trombose. Matsubara et al. (2001) relataram que o polissacarídeo isolado da alga marinha verde *Codium cylindricum* possui um mecanismo inibitório direto sobre a trombina independente da antitrombina III e cofactor II da heparina, estes últimos os reguladores da coagulação sanguínea. Os PS podem envolver diferentes mecanismos de ação anticoagulante e normalmente sugere-se que esses compostos atuam na inibição da via intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação sanguínea quando mensurados pelo teste do TTPA (ATHUKORALA et al., 2006; ZHANG et al., 2008).

O baixo prolongamento das frações anticoagulantes de *S. filiformis* (Tabela 1), por outro lado, sugere talvez que essas galactanas sulfatadas possam exibir efeitos diferentes quando avaliadas em

modelos experimentais de trombose em animais. Galactanas sulfatadas com cadeias longas e estruturas sacarídicas idênticas, mas diferentes no padrão de sulfatação, exibiram efeitos anticoagulantes e antitrombóticos venosos comparativamente distintos quando avaliadas em diferentes concentrações. Galactanas de *B. occidentalis* exibiram efeitos anticoagulante e antitrombótico em baixas doses, inibindo a trombose venosa experimental e prolongando o tempo de recalcificação (*ex-vivo*), mas esses efeitos reverteram em doses mais elevadas. Um efeito procoagulante e protrombótico foi expresso em baixas concentrações de galactanas de *G. crinale*, enquanto em maiores doses inibiu a trombose arterial e venosa em ratos e prolongou o tempo de recalcificação em *ex-vivo*. Os efeitos procoagulantes Fonseca et al. (2008) sugeriram que galactanas sulfatadas de *G. crinale* poderiam ser candidatas como um fármaco proanticoagulante, já que pacientes hemofílicos possuem desordens de sangramento pela deficiência de fatores de coagulação.

Quando os polissacarídeos de *S. filiformis* foram incorporados na dieta do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* e na água de cultivo de pós-larvas dos animais, estes preveniram o impacto do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) (Costa et al, 2006) e melhorou o estado de saúde dos animais (embora não reduzindo, neste último caso, a mortalidade quando os animais foram desafiados ao estresse) (RODRIGUES et al., 2008) quando provenientes dos métodos M I e M II, respectivamente, sendo assim, ferramentas também importantes em estudos imunológicos na prevenção do estresse advindos da intensificação da aquicultura (RODRIGUES, 2006; RODRIGUES et al., 2008) utilizando PS. No entanto, o manejo responsável desses recursos pesqueiros, para propósitos comerciais, é essencial para a sustentabilidade ambiental (RODRIGUES et al., 2008).

Assim, a otimização do rendimento através de dois métodos de precipitação na obtenção de carragenanas resultou em frações com atividade anticoagulante.

## CONCLUSÕES

A alga marinha vermelha *Solieria filiformis* apresenta frações com atividade anticoagulante. Portanto, o emprego de apenas etanol seria uma forma mais econômica de obtenção desses compostos para a realização de outros modelos biológicos experimentais.

## REFERÊNCIAS

AMORIM, R.C.N. *Polissacarídeos sulfatados das algas marinhas vermelhas Gracilaria ornata Areschoug e Halymenia floresia (Clemente) C. Agardh: caracterização química e atividade biológica*. 2005. 99f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

- ANDERSON, L.O. et al. (1976). Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel-filtration. *Thrombosis Research*, v.9, n.6 p.575-583, 1976.
- ATHUKORALA, Y. et al. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresearch Technology*, v.98, n.9, p.1711-1716, 2007.
- ATHUKORALA, Y. et al. An anticoagulant polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*, v.66, n.2, p.184-191, 2006.
- BEZERRA-NETO, J.T.B. et al. Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) HOWE: análise por duas metodologias de precipitação. *Revista Brasileira Engenharia de Pesca*, v.3, n.2, p.50-62, 2008.
- BIRD, K.T. Agar production and quality from *Gracilaria* sp. strain G-16: effects of environmental factors. *Botanica Marina*, v.31, p.33-39, 1988.
- COSTA, F.H.F. et al. Enhancement of disease resistance against infectious myonecrosis virus (IMNV) of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* by sulfated polysaccharide extracts from the red seaweeds *Botryocladia occidentalis* and *Solieria filiformis*. Feira Nacional de Camarão. Suplemento 2005. Disponível em: <http://www.agriambi.com.br/Revista>. Acesso em: 24 de out. de 2006.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemical*, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- FARIAS, W.R.L. et al. Enhancement of growth in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from marine algae. *Revista Ciência Agrônômica*, v.35, n.especial, p.189-195, 2004.
- FARIAS, W.R.L. et al. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *The Journal of Biological Chemistry*, v.275, n.38, p.29299-29307, 2000.
- FARNDAL, R.W.; BUTTLE, D.J.; BARRETT, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimistry et Biophysica Acta*, v.883, n.2, p.173-177, 1986.

FONSECA, R.J.C. et al. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. *Thrombosis and Haemostasis*, v.99, p.539-545, 2008.

GLICKSMAN, M. *Food hydrocolloids. Natural plant exudates – seaweed extracts*. Baton Raton: CRC Press, 1983.

HEO, S.J. et al. Antioxidant activity of enzymatic extracts from seaweeds. *Algae*. v.18, p.71-81, 2003.

HAROUN-BOUHEDJA, F. et al. Relation between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thrombosis Research*, v.100, n.5, p.453-459, 2000.

KJELLÉN, M.; LINDAHL, U. Proteoglycans: Structures and interactions. *Annual Review of Biochemistry*, v.60, p.443-475, 1991.

LEVRING, T.; HOPPE, H.A.; SCHMID, O.J (EDs). *Marine algae. A survey of research and utilization*. Botanical Marine Handbook, 1969. 421p.

MATSUBARA, K. et al. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.28, n.5, p.395-399, 2001.

MOURÃO, P.A.S.; PEREIRA, M.S. Searching for alternatives to heparin: Sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends Cardiovascular Medicine*, v.9, n.8, p.225-232, 1999.

NADER, H.B. et al. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. *Brazilian Journal Medicine of Biological Research*, v.34, p.699-709, 2001.

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. *In: The polysaccharides*. New York: Academic Press, 1983. 195p.

PERCIVAL, E; MCDOWELL, R.H. *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. New York: Academic Press, 1967. 219p.

PEREIRA, M.G. et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action?. *Carbohydrate Research*. v.340, n.12, p.2015-2023, 2005.

PUSHPAMALI, W.A. et al. Isolation and purification of an anticoagulant from fermented red seaweed *Lomentaria catenata*. *Carbohydrate Polymers*, v.73, n.2, p.274-279, 2008.

RODRIGUES, J.A.G. et al. Avaliação dos efeitos da imersão das pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* em águas de cultivo com polissacarídeos sulfatados. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v.3, n.2, p.80-91, 2008.

RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Purificação e atividade anticoagulante *in vitro* de galactanas sulfatadas extraídas da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. *Revista Brasileira Engenharia de Pesca*, v.3, n.2, p.16-29, 2008.

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

RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Caulerpaceae, Chlorophyta). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, XIV, Fortaleza. Anais... Fortaleza: Centro de Convenções de Fortaleza, 2005. p.1693-1701.

SZE, P. *A biology of the algae*. New York: McGraw-Hill, 1997. 278p.

TEIXEIRA, V.L. Produtos naturais marinhos. In: R. C. PEREIRA; A. SOARES-GOMES (Ed.). *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro (RJ): Ed. Interciência, 2002. p.249-279.

TORRES, V.M.T. *Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha Champia feldmannii*, 2005. 35f Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

VILLANUEVA, R.D.; PAGBA, C.V.; MONTANO, N.E. Optimized agar extraction from *Gracilaria eucheumoides* Harvey. *Botanica Marina*, v.40, p.369-372, 1997.

WEITZ, J. New anticoagulant strategies. Current status and future potentials. *Drugs*, v.48, p.485-497, 1994.

ZHANG, H.J. et al. Chemical Characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. *Carbohydrate Polymers*, v.71, n.3, p.428-434, 2008.

