

POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA RODOFÍCEA *Halymenia pseudofloresia* (COLLINS & M. HOWE): ANÁLISE DE METODOLOGIAS DE PRECIPITAÇÃO¹

José Ariévilo Gurgel RODRIGUES*, Wladimir Ronald Lobo FARIAS*

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

*e-mails: arieviloengpesca@yahoo.com.br; wladimir@ufc.br

Recebido em: 12 de outubro de 2009

Resumo - Os polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas complexas e heterogêneas de grande interesse em Biotecnologia. A rodofíceia *Halymenia pseudofloresia* tem sido relatada como possuidora de PS com atividades biológicas. Porém, o emprego de diferentes técnicas pode influenciar o rendimento e/ou as propriedades químicas desses compostos. Desta forma a busca por novas estratégias de obtenção desses polímeros sugerem estudos. Avaliou-se a eficiência de duas metodologias de precipitação (M I e M II) dos PS isolados da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia*, comparando o rendimento, o fracionamento e o grau de purificação. O PS total (PST) foi obtido com papaína bruta em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM. O PST assim obtido foi precipitado com uma solução de cloreto cetilpiridínio (CCP) a 10% (M I) ou, alternativamente, com etanol absoluto (M II). O PST foi analisado por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose utilizando um gradiente de NaCl, sendo as frações de PS obtidas submetidas a procedimento de eletroforese em gel de agarose a 0,5%. Verificou-se que tanto os rendimentos como os perfis cromatográficos de PST foram diferentes entre os métodos. O M II foi mais eficiente na obtenção de PST (46,08%) quando comparado ao M I (41,16%). A separação de seis diferentes frações de PS (F I; F II; F III; F IV; F V e F VI), eluídas com 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50 e 1,75 M de sal, respectivamente, também foram obtidas com o emprego do M II quando comparadas ao M I, porém revelando, por eletroforese, moléculas com baixo grau de purificação em ambos os métodos. Por outro lado, os resultados sugerem que a utilização de apenas etanol seria uma forma mais econômica para a obtenção de PS da rodofíceia *H. pseudofloresia*.

Palavras-chaves: Halymeniaceae, Halymeniales, polímeros de carboidratos, métodos de obtenção.

SULFATED POLYSACCHARIDES FROM *Halymenia pseudofloresia* (RHODOPHYCEAE) (COLLINS & M. HOWE): ANALYSIS OF PRECIPITATION METHODS

Abstract – Sulfated polysaccharides (SP) are complex and heterogeneous macromolecules of a great interest in Biotechnology. The *Halymenia pseudofloresia* rhodophyceae has been reported to have SP possessing biological activities. However, the employment of different techniques can influence the yield and/or chemical properties of these compounds. The search of new strategies of obtaining these polymers suggests studies. It was aimed to evaluate the efficiency of two precipitation methods (M I and M II) of SP isolated from the red marine alga *H. pseudofloresia* comparing the yield, fractionation and purification degree. Total SP (TSP) was obtained with crude papain in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA, and then precipitated with a 10% cetylpyridinium chloride (CPC) solution (M I) or, alternatively, by absolute ethanol (M II). The TSP was analyzed by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose column using a NaCl gradient. The obtained SP fractions were submitted to 0.5% agarose gel electrophoresis procedure. The yields and the chromatographic profiles were different between the methods. TSP was more efficient obtained in M II (46.08%) when compared to M I (41.16%), and six different fractions of SP (F I, F II, F III, F IV, F V and F VI), eluted at 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 and 1.75 M of salt, respectively, were also obtained using the M II when compared to M I, but on both methods the electrophoresis procedure revealed molecules with low degree of purification. On the other hand, the results suggest that the only use of ethanol would be a more economical procedure for obtaining SP from *H. pseudofloresia* rhodophyceae.

Keywords: Halymeniaceae, Halymeniales, carbohydrate polymers, obtaining methods.

¹Pesquisa desenvolvida com apoio financeiro da CAPES

INTRODUÇÃO

As algas representam um diversificado grupo de organismos autotróficos que exercem papéis biológicos importantes no meio ambiente, contribuindo desde a produção de oxigênio até a produção de diferentes moléculas a partir da energia emitida pelo sol, representando o primeiro elo da cadeia alimentar de vários ecossistemas aquáticos (Sze, 1997; Teixeira, 2002). A biossíntese de compostos conhecidos como polissacarídeos sulfatados (PS) despertam interesse do homem devido as suas propriedades como agentes emulsificantes, gelificantes, espessantes nas indústrias de alimentos (Campo et al., 2009), farmacêutica (Hayashi, Toshimitsu & Kojima, 1996; Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000; Bezerra-Neto, Rodrigues, Pontes & Farias, 2008; Zhang et al., 2008; Rodrigues, Bezerra-Neto, Pontes & Farias, 2009a; Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b; Pontes, Bezerra-Neto, Rodrigues & Farias, 2009; Silva et al., 2010) e outros setores econômicos (Fu, Hou, Yeh, Li & Chen, 2007; Rodrigues et al., 2008; Rodrigues, Júnior, Lourenço, Lima & Farias, 2009c). Vários aspectos quanto em estrutura e metabolismo de polissacarídeos algais podem ser encontrados em revisões específicas (Percival & McDowell, 1967; Painter, 1983).

Nas algas marinhas, os PS podem ser encontrados na forma de galactanas sulfatadas nas algas marinhas vermelhas, de fucanas nas algas pardas ou marrons e, nas clorofíceas, os mais encontrados são as arabino-galactanas (Percival & McDowell, 1967; Painter, 1983), enquanto nos animais os PS mais conhecidos são os glicosaminoglicanos, destacando-se, por exemplo, o condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparina (Kjellèn & Lindahl, 1991), podendo os PS ser expressos em vertebrados (Rodrigues, Vanderlei, Queiroz, Quinderé & Benevides, 2009d) e invertebrados (Mourão & Pereira, 1999).

O ágar, a carragenana e o alginato (conhecidos como ficocolóides) são os principais componentes da parede celular das algas, os quais apresentam aspectos químicos e econômicos importantes na indústria, e que distingue as fontes de espécies produtoras (Percival & McDowell, 1967; Painter, 1983; Campo, Kawano, Silva & Carvalho, 2009). A considerável variação estrutural dos PS obtidos a partir de diferentes espécies de algas marinhas coletadas em diferentes ambientes ou períodos do ano também contribui para a natureza complexa e heterogênea desses compostos (Percival & McDowell, 1967; Painter, 1983; Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000; Marinho-Soriano, 2001; Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b). Ademais, a utilização de diferentes protocolos de extração de PS, incluindo os variáveis processos biotecnológicos neles envolvidos, tal como o emprego de solventes de precipitação, pode ocasionar a obtenção de macromoléculas com propriedades químicas e biológicas diferenciadas (Percival & McDowell, 1967; Bezerra-Neto, Rodrigues, Pontes & Farias, 2008; Rodrigues, Bezerra-Neto, Pontes & Farias, 2009a; Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b; Rodrigues & Farias, 2009; Pontes,

Bezerra-Neto, Rodrigues & Farias, 2009).

Embora bem conhecidos em vários setores econômicos, não há um procedimento padrão para a extração de PS de algas marinhas e algumas pesquisas sugerem o uso de diferentes técnicas e/ou solventes de precipitação como formas alternativas para a obtenção desses compostos heterogêneos presentes em diferentes espécies de algas marinhas a menor custo. A utilização de enzimas proteolíticas (papaína) no processo consecutivo de extração e de álcool na etapa de precipitação de PS da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides* resultou em semelhantes propriedades moleculares quando comparadas àquelas obtidas de um protocolo sugerido padrão (Bezerra-Neto, Rodrigues, Pontes & Farias, 2008). Tal procedimento também foi alternativo para a obtenção de PS da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* por Pontes, Bezerra-Neto, Rodrigues & Farias (2009). Rodrigues, Bezerra-Neto, Pontes & Farias (2009a) constataram que a utilização da mesma metodologia mediante o uso de álcool como solvente alternativo de precipitação dos PS isolados com papaína mostrou ser eficiente para a alga marinha verde *Caulerpa racemosa*, quando frações de PS anticoagulantes superaram as atividades daquelas obtidas de um protocolo utilizado no isolamento dessas moléculas.

Algumas atividades biológicas de interesse em Biotecnologia têm sido relatadas para PS isolados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* (Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b; Rodrigues, Júnior, Lourenço, Lima & Farias, 2009c). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi isolar, fracionar e avaliar o grau de resolução dos PS da rodofícea *H. pseudofloresia*, utilizando duas metodologias de precipitação, contribuindo assim com o desenvolvimento de novos protocolos alternativos de obtenção dessas macromoléculas isoladas de algas, mediante análises bioquímicas comparativas.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA E TRATAMENTO PRELIMINAR DA ALGA MARINHA

Exemplares arribados da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia* (Collins & M. Howe) foram coletados na zona entre marés da Praia de Flecheiras-Trairí-Ceará (Julho/2005) e a pesquisa desenvolvida no laboratório de Bioquímica Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará. No laboratório, as algas foram lavadas com água destilada, desidratadas em estufa (40 °C; 15 h), cortadas em pequenos pedaços e armazenadas em frasco fechado para posterior extração do PS total (PST).

EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

O PST foi obtido a partir de duas metodologias (M I e M II), diferindo apenas quanto ao uso do agente precipitante de PS.

MÉTODO I

O PST foi obtido de acordo como previamente descrito por Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias (2009b). Inicialmente, a alga triturada (2 g) foi hidratada em 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (AcNa) (pH 5,0) contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM, e digerida com uma solução de papaína bruta (30 mg mL⁻¹) durante 24 horas a 60 °C em banho-maria. Em seguida, o material foi filtrado, centrifugado (7965 × g; 4°C; 20 min.) e, ao sobrenadante, foram adicionados 20 mL de uma solução de cloreto cetilpiridínio (CCP) a 10% (24 h; 25 °C) para a precipitação dos PS. Logo após uma nova centrifugação, o extrato polissacarídico foi lavado (200 mL; CCP 0,05%), dissolvido em 174 mL de NaCl 2 M: etanol absoluto (100: 15; v/v) e novamente precipitado através da adição de 200 mL de etanol absoluto (24 h; 4 °C). Em seguida, o material foi lavado com 200 mL de etanol absoluto a 80% (2 ×), etanol absoluto (200 mL; 1 ×) e, finalmente, submetido a secagem por estufa (24 h; 60 °C).

MÉTODO II

O PST foi obtido de acordo com Rodrigues, Bezerra-Neto, Pontes & Farias (2009a). Inicialmente, a alga triturada (2 g) foi hidratada em 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (AcNa) (pH 5,0) contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM, e digerida com uma solução de papaína bruta (30 mg mL⁻¹) durante 24 horas a 60 °C em banho-maria. Em seguida, o material foi filtrado, centrifugado (7965 × g; 4°C; 20 min.) e, ao sobrenadante, foram adicionados três volumes de etanol absoluto para precipitação dos PS por 48 h em freezer (- 20 °C). Em seguida, o material foi centrifugado e submetido a duas lavagens com 200 mL de etanol absoluto a 80% e uma vez com etanol absoluto (200 mL). Finalmente, o PST foi seco em estufa (24 h; 60 °C).

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

O PST (10 mg) foi dissolvido em tampão AcNa 0,1 M (2 mg mL⁻¹) e submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose (6,5 × 1,5 cm) equilibrada e percolada com tampão AcNa 0,1 M até a completa remoção dos polissacarídeos não retidos, seguido do fracionamento dos PS por eluição (stepwise) com o mesmo tampão de equilíbrio contendo NaCl em diferentes concentrações (0,50; 0,75; 1,00, 1,25, 1,50 e 1,75 M) utilizando um coletor de frações (FRAC-920) com fluxo ajustado (60 mL h⁻¹), como previamente também descrito (Rodrigues *et al.*, 2009b). As frações de PS (5,0 mL) foram monitoradas através da propriedade metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno (ADM) (Farndale, Buttle & Barrett, 1986) em espectrofotômetro ajustado a 525 nm. As frações metacromáticas assim obtidas foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e concentradas por liofilização para os ensaios posteriores.

ANÁLISES QUÍMICAS

A detecção de açúcares totais (AT) das frações de PS obtidas do procedimento de cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) foi determinada pelo método fenol-ácido sulfúrico (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956). A determinação de sulfato também foi realizada através da medida da área metacromática integrada do perfil cromatográfico em DEAE-celulose, utilizando-se o programa ORIGIN 7.0.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Com a finalidade de avaliar possíveis diferenças moleculares quanto em densidade de cargas e no padrão de resolução, o PST e as frações de PS (25 µg) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,5% (Dietrich & Dietrich, 1976) em tampão 1,3 - acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0) entre os métodos. Desta forma, os PS foram aplicados no gel e a corrida foi realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após o procedimento, as amostras presentes no gel foram fixadas com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio 0,1% por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% e, finalmente, descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v/v/v).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de dois protocolos para a obtenção do PST da rodofícea *H. pseudofloresia* resultou em uma diferença no rendimento de apenas 4,92%, a partir da alga desidratada em estufa (15 h; 40 °C) e triturada. A maior quantidade de PST foi obtida no M II (46,08%) quando comparado ao M I de obtenção (41,16%), respectivamente (Figura 1).

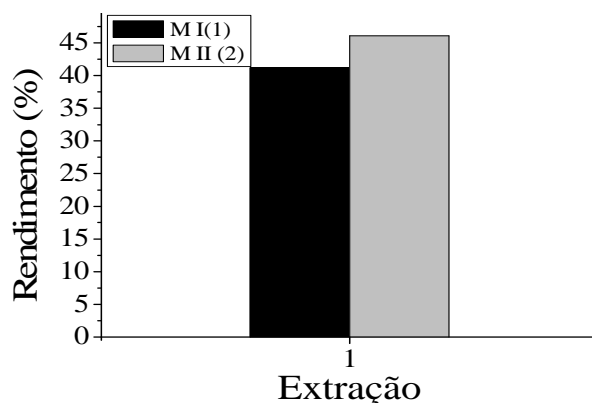


Figura 1. Rendimento, por método, dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. A alga foi desidratada (15 h; 40 °C) e triturada para posterior extração do PST com papaína em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5mM em banho-maria (24 h; 60 °C). O rendimento do PST foi expresso em porcentagem, após seco em estufa (24 h; 60 °C).

A diferença nos rendimentos de PST sugere a influência do método de precipitação utilizado (Percival & McDowell, 1967; Rodrigues, Bezerra-Neto, Pontes & Farias, 2009a) e algumas pesquisas revelam que o emprego de álcool como precipitante alternativo para concentração de PSTs isolados de algas marinhas também sugere ser um solvente eficaz na obtenção desses compostos. Por exemplo, a extração proteolítica de PSTs das algas marinhas *C. sertularioides* (Bezerra-Neto, Rodrigues, Pontes & Farias, 2008), *C. racemosa* (Rodrigues, Bezerra-Neto, Pontes & Farias, 2009a) (Chlorophyceas) e *S. filiformis* (Pontes, Bezerra-Neto, Rodrigues & Farias, 2009) (Rhodophyceae) resultaram em rendimentos de PSTs, quando concentrados com álcool (M II), de 8,10; 13,00 e 43,40%, respectivamente, após a realização de extrações sequenciais desses compostos a partir das espécies, sendo, no geral, semelhantes àqueles rendimentos de PSTs obtidos pelo M I (7,10; 15,75 e 46,80%, respectivamente). A otimização do rendimento de PST da mesma espécie utilizada neste trabalho, Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias (2009b) obtiveram, mediante a realização de três extrações de PST, 47,14% de rendimento total utilizando o M I. Portanto, a realização de extrações sequenciais de PST com papaína utilizando o M II de obtenção também sugere estudos de maneira tornar ótimo alternativamente o rendimento de polissacarídeos isolados de *H. pseudofloresia* e, consecutivamente, com posteriores aplicações em Biotecnologia (Hayashi, Toshimitsu & Kojima, 1996; Fu, Hou, Yeh, Li & Chen, 2007; Campo, Kawano, Silva & Carvalho, 2009; Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b; Rodrigues, Júnior, Lourenço, Lima & Farias, 2009c; Silva et al., 2010).

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

Os perfis cromatográficos obtidos em DEAE-celulose foram diferentes entre os métodos (Figura 2). A separação de seis frações diferentes de PS (F I; F II; F III; F IV; F V e F IV), eluídas nas concentrações 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50 e 1,75 M de NaCl, respectivamente, foram obtidas no M II (Figura 2B), enquanto o M I resultou em cinco frações polissacarídicas sulfatadas (F I; F II; F III; F IV e F V), eluídas com 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 e 1,50 M de NaCl, respectivamente (Figura 2A).

Avaliando a eficiência dos métodos M I e M II de obtenção na concentração por precipitação dos PSTs isolados de diferentes hidrolisados enzimáticos (papaína) obtidos da alga marinha verde *C. sertularioides*, Bezerra-Neto, Rodrigues, Pontes & Farias (2008) observaram semelhantes perfis cromatográficos em DEAE-celulose entre os métodos utilizados, sugerindo a obtenção do mesmo grupo de moléculas, enquanto o emprego de ambas as metodologias na obtenção de PST oriundos de extração sequenciais resultou na separação de diferentes frações polissacarídicas para as espécies *S. filiformis* e *C. racemosa*, respectivamente, segundo Pontes, Bezerra-Neto, Rodrigues & Farias, (2009) e Rodrigues, Bezerra-Neto, Pontes & Farias (2009a). Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio

& Farias (2009b) também constatarem diferentes perfis cromatográficos de PST da rodófitca *H. pseudofloresia*, quando três digestões com papaína foram realizadas. Desta forma, as pesquisas demonstram que as características desses compostos isolados de diferentes extrações, quando concentrados por diferentes solventes e fracionados em colunas de separação (DEAE-celulose), variam de espécie para espécie, podendo também vir a ser uma ferramenta valiosa em estudos taxonômicos de algas (Rodrigues & Farias, 2009) e identificação de novos PS com atividade anticoagulante (Bezerra-Neto, Rodrigues, Pontes & Farias, 2008; Rodrigues, Bezerra-Neto, Pontes & Farias, 2009a; Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b; Pontes, Bezerra-Neto, Rodrigues & Farias, 2009).

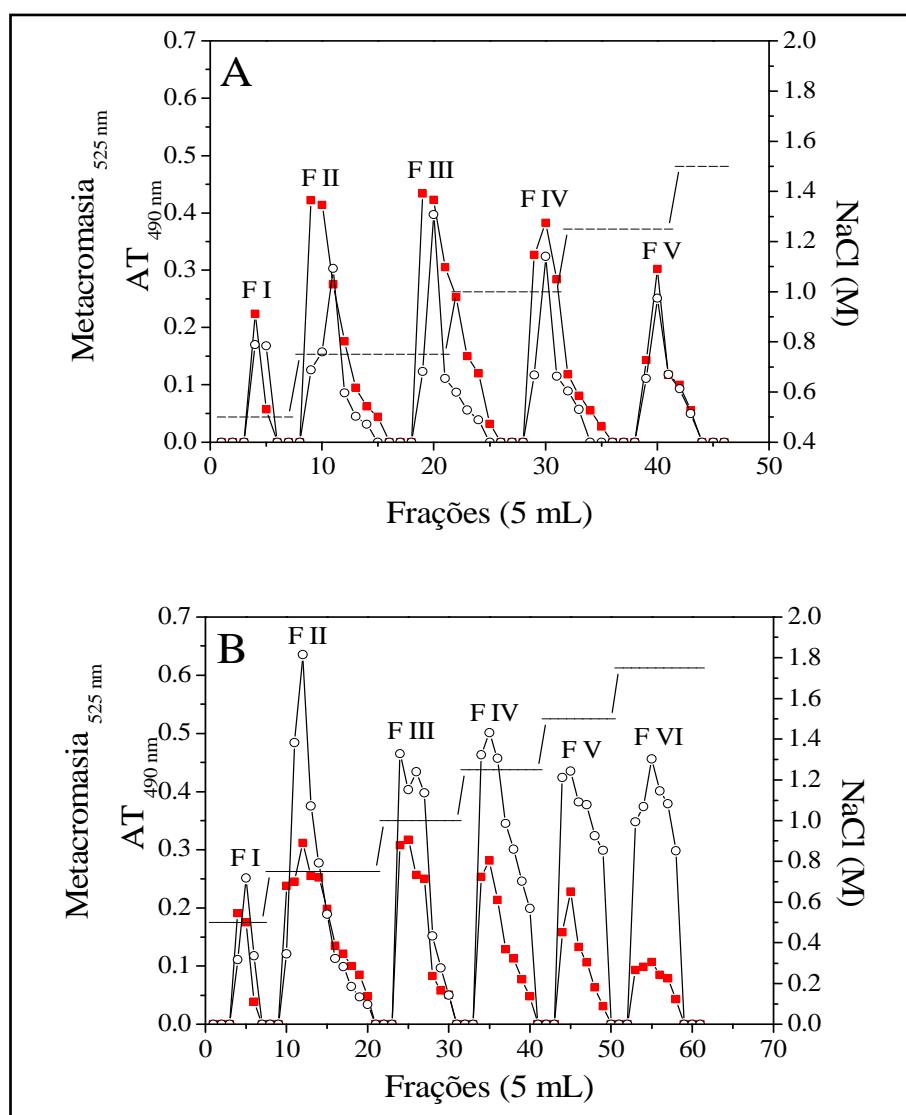


Figura 2. Cromatogramas dos PST obtidos pelos métodos I (A) e II (B) de *Halymenia pseudofloresia* em coluna de DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada e lavada com tampão AcNa 0,1 M. Os PS adsorvidos no gel foram eluídos com o tampão de AcNa contendo NaCl em concentrações diferentes (0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50 e 1,75 M). Os PS foram monitorados através da propriedade metacromática com o 1,9 azul-dimetilmetileno a 525 nm. (■—■) metacromasia (PS); (○—○) açúcares totais (AT) e (--) gradiente salino (stepwise).

Neste trabalho, o procedimento de cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) do PST mostrou diferentes perfis entre os métodos utilizados (Figura 2). Curiosamente, o M II demonstrou ser mais eficiente na obtenção de frações de PS quando comparado ao M I (Figuras 2A e 2B). A maior quantidade de PST obtido no M II quando comparado ao M I (Figura 1) também justificou o maior número de frações polissacarídicas obtidas (Figura 2B). Tal fato sugere posterior avaliação dessas moléculas, quando obtidas do M II, em diferentes atividades biológicas, tais como anticoagulante e imunoestimulante, como previamente reportadas para esta espécie (Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b; Rodrigues, Júnior, Lourenço, Lima & Farias, 2009c). A semelhante presença dessas moléculas a partir da AMI das frações de PS obtidas de *H. pseudofloresia*, quando obtidas em coluna de DEAE-celulose para ambos os métodos (M I e M II) (Tabela 1), também pode reforçar tal hipótese.

A maior dosagem de AT no perfil de DEAE-celulose pelo método fenol-ácido sulfúrico (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956) das frações de PS obtidas pelo M II de obtenção em comparação ao M I (Figura 2) talvez seja decorrente da agregação com outros componentes presentes na mistura polissacarídica (proteínas, carboidratos neutros etc) pelo solvente álcool (M II), embora sabendo-se que polissacarídeos neutros são fracamente ou dificilmente retidos em colunas de separação de troca iônica (DEAE-celulose), segundo Percival & McDowell (1967).

Tabela 1. Área metacromática integrada (AMI) das frações polissacarídicas obtidas de ambos os métodos por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) da rodófitocea *Halymenia pseudofloresia*

Método	Fração	NaCl (M)	AMI (%)
I	F I	0,50	5,12
	F II	0,75	27,16
	F III	1,00	31,36
	F IV	1,25	23,27
	F V	1,50	13,09
II	F I	0,50	4,97
	F II	0,75	29,47
	F III	1,00	28,03
	F IV	1,25	23,28
	F V	1,50	10,91
	F VI	1,75	3,34

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As frações de PS (F II e F III) obtidas de ambos os métodos, quando submetidas ao procedimento de eletroforese em gel de agarose (Dietrich & Dietrich, 1976), mostraram um padrão de cargas negativas bastante semelhantes entre si, porém diferentes em densidade de cargas (Figura 3). As diferenças encontradas na intensidade metacromática das frações de PS no gel entre os M I e M II também justificam os perfis de DEAE-celulose obtidos (Figura 2). As frações de PS apresentaram um padrão bastante polidisperso em cargas negativas quando também comparadas ao PST, com a utilização das metodologias, denotando assim um baixo grau de purificação dos polissacarídeos obtidos de *H. pseudofloresia*.

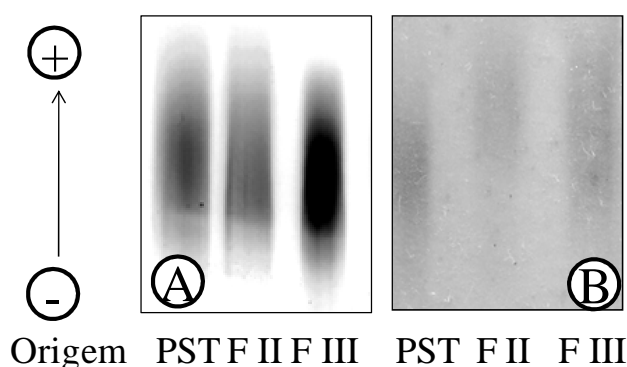


Figura 3. Revelação dos polissacarídeos sulfatados obtidos pelos métodos I (A) e II (B) da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* por eletroforese em gel de agarose a 0,5%. O PST e as frações de PS (F II e F III) presentes no gel foram corados com azul de toluidina a 0,1%.

As características dessas moléculas, quando obtidas do M I e M II, significam, claramente, que o gel em coluna de DEAE-celulose não foi eficiente na purificação dessas moléculas (Figura 3). Tal fato também foi observado na primeira extração dos PSTs da mesma espécie por Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias (2009b), quando o M I de obtenção foi utilizado. A realização de duas novas extrações de PST, utilizando-se do mesmo resíduo algal, por outro lado, resultou em moléculas mais homogêneas, sugerindo que o grau de complexidade esteja diminuindo, o que se supõe ser útil em procedimentos de caracterização de estrutura química desses compostos.

Tendo em vista que não há um protocolo padrão para a obtenção de PS de algas (Percival & McDowell, 1967), haja vista as diferentes conformações estruturais entre as diferentes espécies de algas marinhas existentes (Painter, 1983; Marinho-Soriano, 2001), o que dificulta naturalmente a caracterização de suas estruturas químicas nativas (Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000; Zhang et al., 2008; Campo, Kawano, Silva & Carvalho, 2009), a utilização do M II sugere também ser alternativo para a obtenção de polissacarídeos presentes na espécie em questão.

CONCLUSÃO

A utilização de duas metodologias para a precipitação de polissacarídeos sulfatados presentes em um hidrolisado enzimático (papaína), obtido da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*, resultou em perfis cromatográficos em DEAE-celulose diferentes entre si, porém revelando, por eletroforese, moléculas com baixo padrão de resolução. Por outro lado, o uso mais econômico de etanol absoluto como agente precipitante para a obtenção desses compostos sugere posteriores estudos de atividades biológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bezerra-Neto, J.T.B., Rodrigues, J.A.G., Pontes, G.C. & Farias, W.R.L. (2008). Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (Gmel) Howe: análise de metodologias de precipitação. *Rev. Bras. Eng. de Pesca*, 3(2): 50-62.
- Campo, V.L., Kawano, D.F., Silva, D.B. & Carvalho, I. (2009). Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. *Carbohydr. Polym.*, 77(2): 167-180.
- Dietrich, C.P. & Dietrich, S.M.C. (1976). Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal. Biochem.*, 70(2): 645-647.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28(3): 350-356.
- Farndale, R.W., Buttle, D.J. & Barrett, A.J. (1986). Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta*, 883(2): 173-177.
- Farias, W.R.L., Valente, A.P., Pereira, M.S. & Mourão, P.A.S. (2000). Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *J. Biol. Chem.*, 275(38): 29299-29307.
- Fu, Y.W., Hou, W.Y., Yeh, S.T., Li, C.H.N. & Chen, J.C. (2007). The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish. & Shell. Immunol.*, 22(6): 673-685.
- Hayashi, K., Toshimitsu, H. & Kojima, I. (1996). A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: *In vitro* and *ex vivo* evaluation of anti-herpes simplex

- virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Resear. and Human Retrov.*, 12(15): 1463-1471.
- Kjellén, M.; Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: Structures and interactions. *Ann. Rev. Biochem.*, 60: 443-475.
- Marinho-Soriano, E. (2001). Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta), Gracilariaceae. *J. Biotechnol.*, 89(1): 81-84.
- Mourão, P.A.S. & Pereira, M.S. (1999). Searching for alternatives to heparin: Sulfated fucans from marine invertebrates. *Tren. Cardio. Med.*, 9(8): 225-232.
- Painter, T.J. (1983). Algal polysaccharides. *In: The polysaccharides*. New York: Academic Press.
- Percival, E. & McDowell, R.H. (1967). *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. New York: Academic Press.
- Pontes, G.C., Bezerra-Neto, J.T.B., Rodrigues, J.A.G. & Farias, W.R.L. (2009). Carragenanas da rodofícea *Solieria filiformis* (Kützing) P. W. Gabrielson: análise por duas metodologias de precipitação. *Rev. Bras. Eng. de Pesca*, 4(1): 67-79.
- Rodrigues, J.A.G., Júnior, J.S.J., Moreira, P.L., Melo, D.S., Lourenço, J.A., Lima, P.C.W.C., Torres, V.M., Pontes, G.C. & Farias, W.R.L. (2008). Avaliação dos efeitos da imersão de pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* em águas de cultivo com polissacarídeos sulfatados. *Rev. Bras. Eng. de Pesca*, 3(2): 80-91.
- Rodrigues, J.A.G., Bezerra-Neto, J.T.B., Pontes, G.C. & Farias, W.R.L. (2009a). Análise de metodologias na precipitação de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh. *Rev. Bras. Eng. de Pesca*, 4(1): 32-43.
- Rodrigues, J.A.G., Torres, V.M., Alencar, D.B., Sampaio, A.H. & Farias, W.R.L. (2009b). Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. *Rev. Ciên. Agron.*, 40(2): 224-231.
- Rodrigues, J.A.G., Júnior, J.S., Lourenço, J.A., Lima, P.C.W.C. & Farias, W.R.L. (2009c). Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Halymenia pseudofloresia* mediante uma estratégia profilática. *Rev. Ciên. Agron.*, 40(1): p.71-78.
- Rodrigues, J.A.G., Vanderlei, E.S.O., Queiroz, I.N.L., Quinderé, A.L.G. & Benevides, N.M.B. (2009d). Purificação e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados da pele da carpa comum, *Cyprinus carpio*. *Rev. Ciên. Agron.*, 40(3): p.381-387d.

Rodrigues, J.A.G. & Farias, W.R.L. (2009). Avaliação comparativa dos polissacarídeos sulfatados extraídos de rodofíceas *Halymenia* spp.: ferramenta taxonômica para algas?. *Rev. Bras. Eng. de Pesca*, 4(1): 7-20.

Silva, F.R.F., Dore, C.M.P.G., Marques, C.T., Nascimento, M.S., Benevides, N.M.B., Rocha, H.A.O., Chavante, S.F. & Leite, E.L. (2010). Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. *Carbohydr. Polym.*, 79(5):26-33.

Sze, P. (1997). *A biology to the algae*. New York: McGraw-Hill.

Teixeira, V.L. (2002). Produtos naturais marinhos. *In*: Pereira, R. C.; A. Soares-Gomes (Ed). *Biologia Marinha* (pp.249-279). Rio de Janeiro: Ed. Interciência.

Zhang, H.J., Mao, W.J., Fang, F., Li, H.Y., Sun, H.H., Qi, X.H. (2008). Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*, *Carbohydr. Polym.*, 71(3): 423-434.