



Acta Scientiarum. Technology

ISSN: 1806-2563

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá
Brasil

Gurgel Rodrigues, José Ariévilo; Fernandes de Araújo, Ianna Vivianne; Almeida de Paula, Gabriela;
de Brito Lima, Ticiana; Façanha Bessa, Érika; Barros Benevides, Norma Maria
Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em
Flecheiras, Estado do Ceará, Brasil
Acta Scientiarum. Technology, vol. 33, núm. 2, 2011, pp. 137-144
Universidade Estadual de Maringá
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303226531008>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em Flecheiras, Estado do Ceará, Brasil

José Ariévilo Gurgel Rodrigues¹, Ianna Vivianne Fernandes de Araújo¹, Gabriela Almeida de Paula¹, Ticianna de Brito Lima², Érika Façanha Bessa² e Norma Maria Barros Benevides^{2*}

¹Rede Nordeste de Biotecnologia, Av. Paranjana, 1700, 60740-000, Campus do Itaperi, Fortaleza, Ceará, Brasil. ²Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, s/n, 60451-970, Fortaleza, Ceará, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: nmbb@ufc.br

RESUMO. O cultivo da rodofícea *Solieria filiformis* vem sendo desenvolvido na praia de Flecheiras, Estado do Ceará, como perspectiva de utilização sustentável do recurso para biotecnologia, mas o crescimento de epífitas sobre a espécie compromete seu bom crescimento. Desta forma, avaliou-se a eficiência de duas metodologias (M I e M II) no isolamento da Kappa-carragenana (κ -CAR) da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*. A κ -CAR foi obtida mediante digestão proteolítica (M I) ou água quente (80°C) (M II). Os extratos foram analisados quanto à sua composição química, seguido por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-cellulose usando um gradiente de NaCl. A atividade anticoagulante foi avaliada pelo teste do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), usando plasma humano normal e heparina (HEP) padrão (193 UI mg^{-1}). A diferença nos rendimentos foi $4,28 \pm 0,26\%$ ($p < 0,05$). O menor teor de sulfato foi obtido no M I (17,00%) quando comparado ao M II (26,30%) e diferentes perfis cromatográficos foram observados entre os métodos. O M I demonstrou ser eficiente na obtenção de κ -CAR anticoagulantes ($2,67 \text{ UI mg}^{-1}$), enquanto o M II é alternativo para indústria de alimentos. Os resultados sugerem que o método de obtenção da κ -CAR da rodofícea *H. musciformis* a ser empregado depende do critério de utilização na indústria.

Palavras-chave: rodofícias, polissacárides sulfatados, métodos de extração, teste do TTPA.

ABSTRACT. Carragennan from *Hypnea musciformis* epiphyte obtained from *Solieria filiformis* experimental culture at Flecheiras, Ceará State, Brazil. *Solieria filiformis* (Rhodophyceae) culture is being developed at Flecheiras Beach, state of Ceará, Brazil, for its future sustainable use in biotechnology. However, epiphyte growth on the species jeopardizes suitable development. The efficiency of two methods (M I and M II) in the isolation of kappa-carrageenan (κ -CAR) from red marine alga *Hypnea musciformis* has been evaluated. κ -CAR was obtained by proteolytic digestion (M I) or by hot water (80°C) (M II) and extracts were analyzed with regard to their chemical composition and then by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose column with NaCl gradient. Anticoagulant activity was evaluated by the activated partial thromboplastine time (APTT) test with common human plasma and standard heparin (HEP) (193 IU mg^{-1}). Yield difference reached $4.28 \pm 0.26\%$ ($p < 0.05$), and the lowest sulfate content was obtained with M I (17.00%) when compared to that with M II (26.30%). Further, different chromatographic profiles were reported between the two methods. Whereas M I was efficacious in obtaining κ -CAR anticoagulants (2.67 IU mg^{-1}), alternative M II was efficient for the food industry. Results suggest that κ -CAR extraction method from *H. musciformis* depends on the industry's usage criterion.

Keywords: rhodophyceae, sulfated polysaccharides, extraction methods, APTT test.

Introdução

Algumas marinhas vermelhas biosintetizam galactanas sulfatadas (GS), polímeros de açúcares complexos e heterogêneos constituídos de unidades repetitivas alternadas de β ($1 \rightarrow 4$) D-galactopiranose e α ($1 \rightarrow 3$) galactopiranose dotados de radicais sulfatos os quais são componentes da matriz

extracelular, de grande aplicação em Biotecnologia (FARIAS et al., 2000; ARAÚJO et al., 2008; FONSECA et al., 2008; CAMPO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009a; RODRIGUES et al., 2009b). O ágar e as carragenanas (CAR) são os hidrocoloides isolados de rodofícias de elevado valor comercial pelas suas propriedades funcionais físicas

na indústria de alimentos (FRIEDLANDER; ZELIKOVITCH, 1984; MELO et al., 2002; MACIEL et al., 2008; CAMPO et al., 2009) e para outros setores econômicos (ARAÚJO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009b; SILVA et al., 2010), o que tem motivado o cultivo desses organismos em vários países, citando-se, por exemplo, as espécies *Pterocladiella capillacea*, *Hypnea cornuta* (FRIEDLANDER; ZELIKOVITCH, 1984), *Gracilaria chilensis* (BUSCHMANN et al., 2001), *Kappaphycus alvarezii* (MUÑOZ et al., 2004), *Hypnea musciformis* (GANESAN et al., 2006) e *Gracilaria birdiae* (MACIEL et al., 2008).

Estudos demonstram que considerável variação estrutural também pode ocorrer entre esses compostos obtidos de diferentes espécies de algas e quando elas são coletadas em diferentes períodos do ano, contribuem para alta complexidade e heterogeneidade desses compostos (FARIAS et al., 2000), quando também são influenciadas pelas condições climáticas ambientais (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; FRIEDLANDER; ZELIKOVITCH, 1984; MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003). Além desses fatores, a utilização de diferentes metodologias na extração de polissacarídeos sulfatados (PS), bem como aos diferentes processos biotecnológicos de obtenção neles envolvidos, tais como as técnicas de extração e o uso de solventes de precipitação, podem vir a influenciar o rendimento, as propriedades físico-químicas e a atividade biológica (PERCIVAL; McDowell, 1967; CAMPO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009a), que assim determinam o valor desses compostos na indústria (MARINHO-SORIANO, 2001; CAMPO et al., 2009; SILVA et al., 2010).

O uso terapêutico da heparina (HEP), um PS mundialmente utilizado na prevenção e tratamento de pessoas acometidas por doenças cardiovasculares, é limitado pelos riscos de hemorragia, plaquetopenia e viral (MOURÃO; PEREIRA, 1999), mesmo aquela de baixo peso molecular (THOMAS, 1997). Até recentemente, a baixa qualidade de algumas preparações de HEP rotineiramente utilizadas para cirurgias cardíacas no Brasil, decorrente da presença de contaminantes, também foi relatada, podendo ocasionar aumento significativo do número de casos de discrasia sanguínea, aumento de reoperações e efeitos adversos (MELO et al., 2008), motivando assim a busca crescente por novos heparinoides (FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; FONSECA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009a; RODRIGUES et al., 2009c; RODRIGUES et al., 2010).

As CARs, em especial, compõem uma família de GS que sofrem diversas variações originadas de substituições das hidroxilos livres. Esses PS são naturalmente divididos em seis formas básicas: Iota (ι)-, Kappa (κ)-, Lambda (λ)-, Mu (μ)-, Nu (ν)- e Teta (θ)- CAR, sendo esta classificação química importante comercialmente e para a distinção das fontes das diferentes espécies de rodofícias produtoras (CAMPO et al., 2009).

A alga marinha vermelha *H. musciformis* (Wulfen) Lamouroux possui como constituinte preponderante de parede celular a κ -CAR (STANLEY, 1987). Essa espécie cresce naturalmente como epífita sobre a rodofícia *Solieria filiformis*, uma das espécies nativas cultivadas experimentalmente desde 2006 na praia de Flecheiras, Estado do Ceará, como parte de um projeto de pesquisa em colaboração com a comunidade local da região e o Instituto Terramar, comprometendo assim o bom desempenho desta última. As condições climáticas ambientais favorecem o cultivo de algas na região e, consequentemente, para estudos de caracterização físico-química de ficocoloides, agregando, assim, valores econômicos/sociais/ambientais (MACIEL et al., 2008). Este trabalho avaliou a eficiência de duas metodologias de extração da κ -CAR de *H. musciformis* para biotecnologia, contribuindo com os estudos sobre a utilização sustentável dos recursos marinhos cearenses.

Material e métodos

Obtenção da alga marinha e extração da κ -CAR

Exemplares da alga marinha epífita *H. musciformis* (Wulfen) Lamouroux foram obtidos de exemplares cultivados de *S. filiformis* (Rhodophyta) fixados em estruturas *long-line* localizadas na região costeira da Praia de Flecheiras, Trairi, Estado do Ceará e a pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. Em laboratório, o material foi lavado com água destilada e separado de organismos incrustantes, permanecendo estocado (-20°C) até a extração dos polissacarídeos. Para extração da κ -CAR, duas metodologias (M I e M II) foram utilizadas.

Método I

A extração da κ -CAR foi realizada de acordo com Farias et al. (2000). Inicialmente, a alga triturada (5 g) foi hidratada em 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (AcNa) (Vetec Química) (pH 5,0) contendo EDTA 5 mM (QEEL) e cisteína 5 mM (Sigma Chemical), e digerida com uma solução de

papaína bruta (30 mg mL^{-1}) (Vetec Química) durante 6h a 60°C em banho-maria (MARCONI, modelo MA 159). Em seguida, o material foi filtrado, centrifugado ($2725 \times g$; 4°C ; 30 min.) e, ao sobrenadante, foram adicionados 48 mL de cloreto cetilpiridinio (CCP) (Sigma Chemical) a 10% (24h; 25°C) para a precipitação da κ -CAR. Logo após uma nova centrifugação, o extrato polissacarídico foi lavado (200 mL; CCP 0,05%), dissolvido em 174 mL de NaCl 2 M: etanol comercial (100: 15; v/v⁻¹) e novamente precipitado pela adição de 200 mL de etanol comercial (24h; 4°C). Em seguida, o material foi lavado com 200 mL de etanol comercial a 80% (2 ×), etanol comercial (200 mL; 1 ×) e, finalmente, submetido à secagem por estufa em circulação de ar (3h; 60°C) (MARCONI, modelo MA 035) (n = 3).

Método II

Inicialmente, a alga triturada (5 g) foi hidratada em 1,5% de água destilada (massa/volume) e submetida à temperatura de 80°C em agitação (4h) para a extração da κ -CAR. Em seguida, o extrato polissacarídico assim obtido foi filtrado e centrifugado ($2725 \times g$; 4°C ; 30 min.) e, ao sobrenadante, foi adicionado etanol comercial (1:3; v/v⁻¹) para precipitação da κ -CAR durante 24h a 4°C . Logo após uma nova centrifugação, o material foi seco por estufa em circulação de ar (3h; 60°C) (MARCONI, modelo MA 035) (n = 3).

Os dados obtidos de ambos os métodos de extração foram expressos como Média ± Desvio-Padrão (D.P.) e analisados por meio do teste de *t*-Student, considerando p < 0,05.

Análises químicas

O conteúdo de carboidratos totais (CT) da κ -CAR foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956), utilizando a D-galactose para a obtenção da curva-padrão. O conteúdo de proteínas contaminantes (PC) foi estimado pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão. O teor de sulfato livre (SL) foi determinado pelo método gelatina-bário, descrito por Dodgson e Price (1962), usando sulfato de sódio para a obtenção da curva-padrão.

Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-cellulose

A κ -CAR (15 mg), dissolvida em tampão AcNa 0,05 M (2 mg mL^{-1}), foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-cellulose ($12 \times 0,55 \text{ cm}$) (Sigma Chemical) equilibrada e percolada com tampão AcNa 0,05 M até a completa remoção dos polissacáideos não-retidos, seguido do fracionamento da κ -CAR por eluição (stepwise),

com o mesmo tampão de equilíbrio contendo NaCl em diferentes concentrações (0,50; 0,75 e 1,00 M) utilizando um coletor de frações (FRAC-920), com fluxo ajustado (60 mL h^{-1}). As frações de κ -CAR (2,5 mL) foram monitoradas pela propriedade metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno (ADM) (FARNDALE et al., 1986) em espectrofotômetro (Amersham Biosciences Ultrospec 1100), ajustado a 525 nm. As frações metacromáticas obtidas foram dialisadas (membranas de celulose $43 \times 27 \text{ mm}$, Sigma-Aldrich) exaustivamente contra água destilada mediante a realização de cinco trocas diárias, durante três dias consecutivos, para eliminação do NaCl utilizado no fracionamento da κ -CAR. Em seguida, as frações de κ -CAR foram concentradas por liofilização (LABCONCO, modelo Freezone 4.5) para os ensaios posteriores.

Ensaio anticoagulante "in vitro"

A avaliação da atividade anticoagulante foi realizada por meio do teste do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), segundo especificações do fabricante. Inicialmente, o sangue de humano normal citratado (diferentes doadores) foi centrifugado ($73,75 \times g$; 15 min.) para a obtenção de um plasma pobre em plaquetas. Para a realização do teste, 50 μL de plasma humano foram incubados a 37°C por 3 min. com 10 μL da solução de κ -CAR e 50 μL do reagente TTPA (CLOT, Bios diagnóstica). Após a incubação, foram adicionados 50 μL de cloreto de cálcio 25 mM (CLOT, Bios diagnóstica) à mistura para ativar a cascata de coagulação. Os ensaios foram realizados em duplicita, sendo o tempo de coagulação registrado automaticamente em um coagulômetro (DRAKE, modelo QUICK-TIMER) e a atividade anticoagulante expressa em unidades internacionais (UI) por mg de polissacáideo utilizando a HEP não-fracionada (193 UI mg^{-1}) do Instituto Nacional de Controle e Padrões Biológicos, Potters Bar, Reino Unido. Para a construção da curva-padrão de HEP, utilizou-se a faixa de concentração de 0,01 a 0,10 mg mL^{-1} desse polissacáideo.

Eletroforese em gel de agarose

Com a finalidade de avaliar a κ -CAR isolada, em densidade e padrão de cargas, as frações anticoagulantes (25 μg) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,5% (DIETRICH; DIETRICH, 1976) em tampão 1,3 - acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0) (Aldrich), quando obtidas do M I. Desta forma, as frações de κ -CAR foram aplicadas no gel e a corrida foi realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após o

procedimento, as amostras presentes no gel foi fixada com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilâmônio 0,1% (Vetec Química) por 24h. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% (Vetec Química) e, finalmente, decorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v v⁻¹ v⁻¹).

Resultados e discussão

Rendimento da κ-CAR

O emprego de ambas as metodologias no isolamento da κ-CAR da alga marinha vermelha *H. musciformis* resultou em rendimentos diferentes entre si (Figura 1). A maior quantidade de κ-CAR foi obtida no M I ($49,05 \pm 0,38\%$), enquanto $44,77 \pm 0,91\%$ resultaram com a utilização do M II, a partir da alga desidratada (25°C) e triturada. Portanto, a diferença nos rendimentos de κ-CAR foi $4,28 \pm 0,26\%$ ($p < 0,05$).

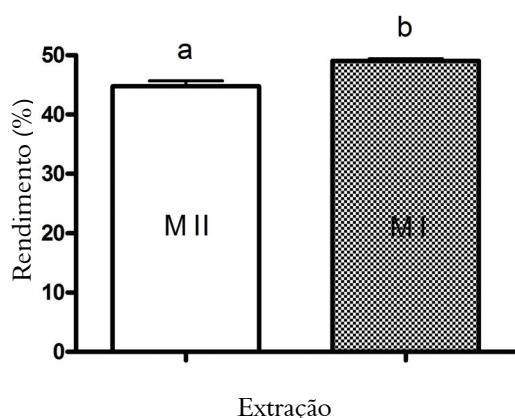


Figura 1. Rendimento, por método, da κ-CAR obtida mediante a utilização do M I e M II da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis*. A alga foi desidratada (25°C) e triturada para extração da κ-CAR com a protease cisteíncina papaína em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) (M I) ou água (80°C) (M II). Letras diferentes sobre as barras representam diferença significativa entre os métodos utilizados em nível de 5%.

As macroalgas marinhas são grandes produtoras de carboidratos (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003; ATHUKORALA et al., 2006; ARAÚJO et al., 2008; CAMPO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009a) e a maricultura de muitos desses organismos vem sendo desenvolvida em diversos países do mundo (FRIEDLANDER; ZELIKOVITCH, 1984; BUSCHMANN et al., 2001; MUÑOZ et al., 2004; GANESAN et al., 2006; MACIEL et al., 2008), como estratégia alternativa de obtenção de novas macromoléculas para o homem.

Neste experimento, os rendimentos de κ-CAR, quando obtidos de ambas as metodologias, foram

superiores aos obtidos por Marinho-Soriano (2001), na extração aquosa de PS (pH 6,5; 1h; 60°C) das rodoficeas coletadas de banco natural *Gracilaria gracilis* (30,00%), *G. dura* (33,50%) e *G. bursa-pastoris* (34,80%), e com papaína de *Champia feldmannii* (36,20%) (ASSREUY et al., 2008). O rendimento total (47,14%) obtido por Rodrigues et al. (2009a), utilizando a rodofícia arribada de banco natural *Halymenia pseudofloresia* mediante extrações consecutivas de polissacarídeos, também foi inferior quando comparado ao M I, mas superou ao obtido no M II neste trabalho (Figura 1). Maciel et al. (2008) obtiveram 6,50% de ágar do extrato aquoso ($25\text{--}28^{\circ}\text{C}$) de *G. birdiae* (Rhodophyta), cultivada na mesma região de cultivo de *S. filiformis* e coleta de *H. musciformis*, mas foi inferior quando comparado à extração aquosa de *G. cornea* (21,40%) de bancos (MELO et al., 2002).

Desta forma, a alga epífita *H. musciformis*, quando obtida de um cultivo experimental, resultou em grandes concentrações de κ-CAR. Os resultados também sugerem que a utilização de extrações sequenciais poderia vir a ser empregada para a obtenção de maiores quantidades desse ficocoloide, de maneira a tornar ótimo seu rendimento final, na perspectiva de novas macromoléculas com propriedades gelificantes, espessantes e emulsificantes para as indústrias de alimentos (MELO et al., 2002; CAMPO et al., 2009) e farmacêutica (ASSREUY et al., 2008; FONSECA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009a).

Análise da composição química e cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose)

A composição química da κ-CAR indicou que o M I apresentou menores teores de CT e SL (43,50 e 17,00%, respectivamente) quando comparados ao M II. Também PC foram detectadas da κ-CAR obtida do M II (Tabela 1). Este fato pode ser o resultado de contaminação com ácidos nucleicos. A ausência de PC da κ-CAR obtida do M I também é justificada pela eficiência do método na digestão enzimática de proteínas pela papaína (RODRIGUES et al., 2010). A coluna de DEAE-celulose foi eficiente no fracionamento da κ-CAR obtida de *H. musciformis*, porém mostrou perfis cromatográficos de κ-CAR diferentes entre os métodos utilizados (Figura 2). A separação de duas diferentes frações metacromáticas de κ-CAR (F I e F II), eluídas nas concentrações 0,50 e 0,75 de NaCl, respectivamente, foram obtidas utilizando o M I, enquanto no M II foram separadas em três diferentes frações de κ-CAR (F I; F II e F III), eluídas nas concentrações de 0,50; 0,75 e 1,00 de NaCl, respectivamente. O maior rendimento de κ-CAR foi obtido nas frações F I, eluídas com 0,50

M de sal, em ambos os métodos, quando comparadas às demais frações obtidas da espécie (Tabela 2). Curiosamente, um número menor de frações de κ -CAR foi obtido no M I (Figura 2), porém em F I e F II observaram-se maiores metacromasias comparadas às frações eluídas nas mesmas concentrações de NaCl utilizando o M II de extração. Por outro lado, o maior número de frações de κ -CAR obtidas no M II justificou o maior teor de SL (Tabela 1). Em suma, a utilização de dois métodos de extração para a κ -CAR da epífita *H. musciformis* resultou em diferença entre os teores de SL.

Tabela 1. Composição química da κ -CAR (*Hypnea musciformis*) obtida de ambos os métodos.

Método	PC*	CT*	SL*
M I	-	43,50	17,00
M II	2,30	46,40	26,30

*Resultados da média de três determinações. - não-detectado.

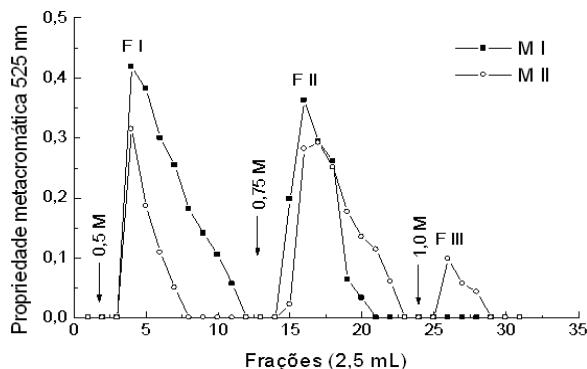


Figura 2. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose da κ -CAR da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* utilizando M I e M II. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0). A κ -CAR adsorvida no gel foi eluída com adição de NaCl (0,50; 0,75 e 1,00 M). (■—■) metacromasia (M I); (○—○) metacromasia (M II); (↓) concentração de NaCl (M).

Tabela 2. Rendimento das frações de κ -CAR obtidas dos métodos M I e M II por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) da rodofícea *Hypnea musciformis*.

Método	Fração	Eluição (NaCl)	Rendimento (%)
M I	F I	0,50	19,70
	F II	0,75	15,58
M II	F I	0,50	7,33
	F II	0,75	2,66
	F III	1,00	-

- não reunida pela escassez de material.

Avaliando a taxa de crescimento específico sobre o rendimento e qualidade das agarófitas *Gracilaria* sp. e *P. capillacea* e das carragenófitas *H. musciformis* e *H. cornuta* cultivadas em condições de campo, Friedlander e Zelikovitch (1984) observaram que o crescimento dessas espécies foi positivamente relacionado com o conteúdo de ficocoloides na principal estação de crescimento. Géis fortes (ágar) coincidiram com o elevado conteúdo de

3,6-anidrogalactose, apresentando alta temperatura de fusão e poder geleificante, e baixos teores de sulfato, enquanto nas espécies biosintetizantes de carragenanas apresentaram géis mais fracos e baixos conteúdos de 3,6-anidrogalactose, com baixas temperaturas de fusão e poder geleificante, e baixos teores de sulfato. Os pesquisadores observaram que a composição química e as propriedades físicas dos géis dos ficocoloides dessas espécies cultivadas, quando comparadas àquelas de bancos, também foram semelhantes.

Neste trabalho, a diferença entre os teores de SL (9,30%) e no fracionamento da κ -CAR obtida da rodofícea *H. musciformis* foram observadas, quando os métodos M I e M II foram utilizados (Tabela 1 e Figura 2). Tal fato sugere a hipótese de Percival e McDowell (1967), reportando que não há um procedimento padrão para extração de PS de algas. Para os autores, PS diferentes em composição e propriedades químicas podem ser obtidos com a utilização de algumas técnicas de separação, tais como a extração diferencial, precipitação por fracionamento com solventes e o emprego de colunas de separação. O emprego deste último tem sido bastante utilizado na separação de PS presentes em algas, revelando características marcantes entre espécies e metodologias na análise de PS, a partir da obtenção de perfis cromatográficos (PEREIRA et al., 2005; ASSREUY et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009a; RODRIGUES et al., 2010).

Atividade anticoagulante

O teste do TTPA mostrou que as frações de κ -CAR da epífita *H. musciformis* obtida do cultivo experimental da rodofícea *S. filiformis* apresentaram atividade anticoagulante somente quando obtidas pelo M I de extração (Tabela 3). No entanto, o TTPA das frações, a uma concentração de 1,00 mg mL⁻¹ de κ -CAR, foi minimamente alterado em 1,54 e 1,15 para 0,50 e 0,75 M de sal, respectivamente, cujas atividades das frações F I e F II da ordem de 2,67 e 2,08 UI mg⁻¹ de κ -CAR foram mensuradas, em relação a HEP não-fracionada (193 UI mg⁻¹). Essas frações, quando submetidas ao procedimento de eletroforese, também praticamente não foram observadas no gel e apresentaram-se parcialmente homogêneas, quando comparadas ao PST (Figura 3), sugerindo a baixa eficiência do método de separação utilizado (DEAE-celulose) na resolução da κ -CAR obtida da alga marinha vermelha *H. musciformis* (Figura 2).

A busca de novos heparinoides tem sido relatada a uma variedade de organismos aquáticos (MOURÃO; PEREIRA, 1999; PEREIRA et al., 2005; ATHUKORALA et al., 2006; FONSECA

et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009c; RODRIGUES et al., 2010). Contudo, pesquisas relacionadas sobre a utilização de algas marinhas nativas, quando cultivadas de maneira sustentável, possuidoras de PS com atividades biológicas, são raras na literatura, por conhecimento.

Tabela 3. Atividade anticoagulante das frações de κ-CAR obtidas por cromatografia de troca iônica de DEAE-cellulose da rodoficea *Hypnea musciformis* em relação à HEP.

Método	Fração	Eluição NaCl (M)	Atividade			
			*	**	***	****
			$T_1 T_0^{-1}$	mg mL ⁻¹	TTPA (s)	UI mg ⁻¹
M I	F I	0,75	1,54	1,00	59,80	2,67
	F II	1,00	1,15	1,00	44,55	2,08
M II	F I	0,50	1,00	-	-	-
	F II	0,75	1,00	-	-	-
	F III	1,00	1,00	-	-	-
HEP	Não-fracionada	-	0,01	40,15	193,00	-
Plasma	-	1,00	-	38,70	-	-

*Atividade expressa pela relação de prolongamento $T_1 T_0^{-1}$ pelo teste do TTPA;

Concentração de κ-CAR para prolongar minimamente o TTPA; *TTPA em segundos; ****Unidades internacionais por mg de polissacarídeo.

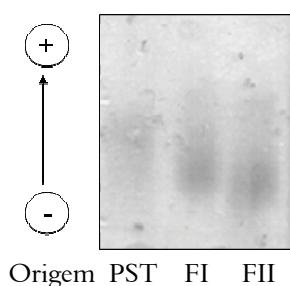


Figura 3. Revelação das frações de κ-CAR obtidas pelo método I da alga marinha vermelha por eletroforese em gel de agarose a 0,5%, quando comparadas ao polissacárido sulfato total (PST). O PST e as frações F I e F II presentes no gel foram corados com azul de toluidina a 0,1%.

Avaliando GS isoladas da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*, coletada de banco natural, Farias et al. (2000) observaram acentuada atividade anticoagulante da espécie. Os pesquisadores relataram que o polissacárido potencializa os reguladores plasmáticos antitrombina e cofator II da heparina sobre a atividade de inibição da trombina, decorrente da presença de dois ésteres de sulfato em um único resíduo de galactose. Quando essa mesma galactana foi avaliada em um modelo de trombose venosa em ratos, foi observada uma potente atividade antitrombótica e sem exibir efeito hemorrágico, quando a dose de 0,20 mg kg⁻¹ exerceu efeito significativo na inibição de trombos nos animais (FARIAS et al., 2001). Esses estudos também levaram a sugerir que o composto age a uma dose antitrombótica 20 vezes menor quando comparado à dose anticoagulante, ou seja, o polissacárido não alterou a coagulação para exercer efeito antitrombótico, sendo assim uma ferramenta importante quando relacionada a outras atividades

biológicas, quando é necessária a administração de maiores doses.

Curiosamente, neste trabalho, observou-se que a utilização do M I na extração da κ-CAR de *H. musciformis* resultou em maior rendimento de carboidratos (Figura 1), mas as análises químicas demonstraram que o referido método foi menos eficiente para a obtenção de κ-CAR (Tabela 1; Figura 2), quando comparado ao M II. Embora com tais diferenças entre os métodos, frações anticoagulantes foram obtidas com a utilização do M I, quando atividades da ordem de 2,67 e 2,08 UI mg⁻¹ para F I e F II, respectivamente, foram mensuradas pelo teste do TTPA, utilizando a HEP como padrão, enquanto frações polissacáridicas solúveis destituídas de atividade anticoagulante foram observadas com a utilização do M II de extração (Tabela 3).

As carragenanas possuem caráter hidrofílico que sofrem diversas variações originadas de substituições das hidroxilas livres. A estrutura da carragenana de *H. musciformis* é preponderantemente do tipo kappa, sendo assim destituída de um grupamento sulfato que esterifica no carbono 6 da unidade B da cadeia principal e assim forma a ligação 3,6-anidrogalactose, e um outro radical sulfato que também se faz ausente na mesma unidade, quando comparada à carragenana do tipo iota (i). Decorrente da eliminação desses dois radicais sulfatos que esterificam em dois carbonos da unidade B da cadeia principal, permite a formação de géis fortes como uma propriedade importante na indústria de alimentos (CAMPO et al., 2009). No entanto, a perda do radical sulfato comparada a sua forma precursora (*mu*-carragenana) sugere a baixa atividade da κ-CAR isolada da espécie (Tabela 3), uma vez que a posição desses radicais sulfatos e/ou a densidade de cargas na estrutura química são consideradas como pré-requisitos importantes para a ação anticoagulante (FARIAS et al., 2000). Em outro contexto, a baixa atividade anticoagulante da κ-CAR de *H. musciformis* talvez possa vir a ser vantajosa em estudos biológicos envolvendo modelos de experimentação animal (MOURÃO; PEREIRA, 1999; FARIAS et al., 2001; FONSECA et al., 2008; SILVA et al., 2010), quando é necessária a administração de maiores doses, além da digestão proteolítica (M I) possuir a propriedade em obter PS mais solúveis em água.

A κ-CAR, obtida da extração aquosa (M II), apresentou-se levemente pigmentada, justificando o teor de PC (Tabela 1), enquanto a obtida por digestão proteolítica (M I) mostrou-se isenta. Este fato sugere o M II como uma forma mais econômica de utilização para indústria de alimentos (MARINHO-SORIANO, 2001; MELO et al., 2002;

MACIEL et al., 2008; CAMPO et al., 2009). Embora sendo de custo mais elevado e com a necessidade de um número maior de etapas de execução, o M I demonstrou ser mais eficiente na obtenção de κ -CAR, sugerindo sua utilização para modelos biológicos experimentais (ASSREUY et al., 2008; FONSECA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009a; RODRIGUES et al., 2010). Segundo Athukorala et al. (2006), o emprego de enzimas é considerado mais eficiente na extração de polissacarídeos presentes no tecido das algas, tornando possível sua solubilização em água para realização de ensaios biológicos e resultando em rendimentos maiores de compostos bioativos.

Vale salientar que os fatores ambientais também podem vir a influenciar o rendimento e as propriedades físico-químicas desses compostos. Marinho-Soriano (2001) avaliaram o rendimento e as propriedades físico-químicas do ágar extraído de *Gracilaria gracilis*, *G. dura* e *G. bursa-pastoris* coletadas de banco natural e observaram variação significativa no rendimento. O elevado conteúdo de 3,6-anidrogalactose em *G. gracilis* e *G. dura* não foi relacionado com teor de sulfato. Por outro lado, para *G. bursa-pastoris*, a correlação desses parâmetros levaram os autores a sugerir a provável presença de sulfato em outras posições na estrutura química em adição a posição 6 de L-galactose.

Portanto, outros métodos de extração e técnicas declareamento da κ -CAR obtida da extração aquosa de *H. musciformis* serão avaliados de maneira a viabilizar o recurso em aplicações biotecnológicas diversas na indústria (grau alimentício), bem como correlacionando propriedades físico-químicas e biológicas desses compostos com as condições climáticas ambientais, durante períodos de coleta desta espécie obtida do cultivo experimental da rodofícea *S. filiformis* no ano. Nessas perspectivas, estudos já estão sendo conduzidos por nosso grupo de pesquisa.

Conclusão

Kappa-carragenana isolada mediante digestão proteolítica (papaína) ou água quente (80°C), seguido de procedimento cromatográfico de troca iônica (DEAE-celulose) da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental da rodofícea *S. filiformis*, revela, por eletroforese, um heparinoide parcialmente purificado e com baixo potencial anticoagulante, a partir do hidrolisado enzimático. Os resultados sugerem que o protocolo de extração do hidrocoloide a ser empregado para a espécie depende do critério de utilização na indústria. Uma avaliação mais detalhada dessas moléculas, uma vez que os fatores ambientais podem afetar a biossíntese

e as propriedades físico-químicas e biológicas, também seria indicada.

Agradecimentos

Ao Programa da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e ao Ministério da Saúde (MS).

Referências

- ARAÚJO, G. S.; FARIAS, W. R. L.; RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; PONTES, G. C. Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia. *Revista Ciência Agronômica*, v. 39, n. 4, p. 548-554, 2008.
- ASSREUY, A. M. S.; GOMES, D. M.; SILVA, M. S. J.; TORRES, V. M.; SIQUEIRA, R. C. L.; PIRES, A. F.; CRIDDLE, D. N.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, n. 4, p. 691-695, 2008.
- ATHUKORALA, Y.; JUNG, W. K.; VASANTHAN, T.; JEON, Y. J. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, n. 2, p. 184-191, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BUSCHMANN, A. H.; CORREA, J. A.; WESTERMEIER, R.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. C.; NORAMBUENA, R. Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture*, v. 194, n. 3-4, p. 203-220, 2001.
- CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVA, D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, n. 2, p. 167-180, 2009.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Analytical Biochemistry*, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulfato content of sulfated polysaccharides. *Biochemical Journal*, v. 84, n. 1, p. 106-110, 1962.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.
- FARIAS, W. R. L.; NAZARETH, R. A.; MOURÃO, P. A. S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *Botryodadlia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, n. 6, p. 1540-1546, 2001.
- FARNDALE, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRET, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 883, n. 2, p. 173-177, 1986.
- FONSECA, R. J. C.; OLIVEIRA, S. N. M. C. G.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MOURÃO, P. A. S. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 3, p. 539-545, 2008.
- FRIEDLANDER, M.; ZELIKOVITCH, N. Growth rates, phycocolloid yield and quality of the red seaweeds, *Gracilaria* sp., *Pterodadiella capillacea*, *Hypnea musciformis*, and *Hypnea cornuta*, in field studies in Israel. **Aquaculture**, v. 40, n. 1, p. 57-66, 1984.
- GANESAN, M.; THIRUPPATTI, S.; JHA, B. Mariculture of *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux in South east coast of India. **Aquaculture**, v. 256, n. 1-4, p. 201-211, 2006.
- MACIEL, J. S.; CHAVES, L. S.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharides from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 4, p. 559-565, 2008.
- MARINHO-SORIANO, E. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaeae). **Journal of Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 81-84, 2001.
- MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaeae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, v. 90, n. 3, p. 329-333, 2003.
- MELO, M. R. S.; FEITOSA, J. P. A.; FREITAS, A. L. P.; PAULA, R. C. M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 4, p. 491-498, 2002.
- MELO, E. I.; PEREIRA, M. S.; CUNHA, R. S.; SÁ, M. P. L.; MOURÃO, P. A. S. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 23, n. 2, p. 169-174, 2008.
- MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 225-232, 1999.
- MUÑOZ, J.; FREILE-PELEGÍN, Y.; ROBLEDO, D. Mariculture of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) color strains in tropical waters of Yucatán, México. **Aquaculture**, v. 239, n. 1-4, p. 161-177, 2004.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. New York: Academic Press, 1967.
- PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MELO, M. R. S.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 12, p. 2015-2023, 2005.
- RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 2, p. 224-231, 2009a.
- RODRIGUES, J. A. G.; JÚNIOR, J. S.; LOURENÇO, J. A.; LIMA, P. C. W. C.; FARIAS, W. R. L. Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofíciea *Halymenia pseudofloresia* mediante uma estratégia profilática. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 1, p. 71-78, 2009b.
- RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUEIROZ, I. N. L.; QUINDERÉ, A. L. G.; BENEVIDES, N. M. B. Purificação e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados da pele da carpa comum, *Cyprinus carpio*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 3, p. 381-387, 2009c.
- RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; BENEVIDES, N. M. B. Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* - extração, fracionamento e atividade anticoagulante. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 2, p. 113-120, 2010.
- 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. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 26-33, 2010.
- STANLEY, N. Production, properties and uses of carrageenan. In: MCHUGH, D. J. (Ed.) **Production and utilization of products from commercial seaweeds**. Roma: FAO Fisheries technical paper, 1987. v. 288, p. 116-146.
- THOMAS, D. P. Does low molecular weight heparin cause less bleeding? **Thrombosis and Haemostasis**, v. 78, n. 6, p. 1422-1425, 1997.

Received on December 18, 2009.

Accepted on June 28, 2010.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.