



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

ARIADNE MARIA CORDEIRO LAVOR

PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DAS ALGAS MARINHAS
Halymenia pseudofloresia, *Spatoglossum schroederi*, *Caulerpa racemosa* E SEUS EFEITOS
NA RESISTÊNCIA DE NAÚPLIOS DE ARTÊMIAS SUBMETIDOS A ESTRESSE
SALINO.

FORTALEZA

2010

ARIADNE MARIA CORDEIRO LAVOR

PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DAS ALGAS MARINHAS
Halymenia pseudofloresia, *Spatoglossum schroederi*, *Caulerpa racemosa* E SEUS EFEITOS
NA RESISTÊNCIA DE NAÚPLIOS DE ARTÊMIAS SUBMETIDOS A ESTRESSE
SALINO.

Monografia submetida ao Departamento do
Curso de Graduação em Engenharia de
Pesca, da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do
título de Engenheira de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir R. L. Farias

FORTALEZA

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L436p Lavor, Ariadne Maria Cordeiro.
Purificação dos polissacarídeos sulfatados das algas marinhas *Halymenia pseudofloresia*, *Spatoglossum schroederi*, *Caulerpa racemosa* e seus efeitos na resistência de naúplios de artêmias submetidos a estresse salino / Ariadne Maria Cordeiro Lavor. – 2010.
32 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2010.
Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.
1. Macroalgas. 2. Resistência. 3. Fracionamento. I. Título.

CDD 639.2



ARIADNE MARIA CORDEIRO LAVOR

PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DAS ALGAS MARINHAS
Halymenia pseudofloresia, *Spatoglossum schroederi*, *Caulerpa racemosa* E SEUS EFEITOS
NA RESISTÊNCIA DE NAÚPLIOS DE ARTÊMIAS SUBMETIDOS A ESTRESSE
SALINO.

Esta monografia foi submetida ao Departamento do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Aprovado em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano (Membro)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio (Membro)
Universidade Federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pela a alegria em me conceber a realização de mais uma etapa da minha caminhada rumo ao sucesso.

Ao meu pai João, a minha mãe Edite pelo o amor e compreensão em todos os momentos da minha vida.

A minha irmã Jéssica, pela amizade e paciência, principalmente em época de prova... Só ela sabe o que passou...

Aos meus irmãos Georgiano, Georgermano e ao meu sobrinho Pedro Emílio, que estiveram sempre presentes e torcendo muito para eu concluir o curso.

Ao meu namorado, Rafael Diógenes, pelo o seu amor, amizade e companheirismo nesta longa batalha... TE AMO!

As minhas amigas super especiais: Aninha, Lídia, Luíza, Raquel e Taty, por estes cinco anos MARAVILHOSOS. Foi com vocês que aprendi que na faculdade podemos ter amigas de verdade. Obrigada pelas gargalhadas no intervalo de aulas, pelas raríssimas saídas juntas, por tudo! Obrigada por vocês fazerem parte da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias, pela orientação e incentivo a pesquisa durante a graduação em Engenharia de Pesca.

Ao Professor Alexandre Sampaio, pela amizade e pelo o apoio nas horas mais decisiva na minha vida acadêmica.

Aos amigos da Pesca: Paloma (a loura), Rafinha, Andrea, Diego Wesley, Levy, Ricardo, Nonato Jr, Luana, Carol, Mirela, Fabiana, Kelma, Marcia e Alan pelas gargalhadas boas que demos nos corredores da pesca.

Aos meus amigos da biblioteconomia: Diana, Mari, Josi, Rafinha, Dani, Marcela, Marília, Ana e Aldenor, pelas horas de fofocas na cantina...

Ao CNPQ pelo o apoio financeiro.

A todos o meu muito obrigada!

RESUMO

Muitas substâncias têm sido descritas como imunoestimulantes na aquicultura, dentre estas os polissacarídeos sulfatados (PS) obtidos de algas marinhas que, por definição, são macromoléculas complexas formadas por unidades repetitivas de açúcares e carregados negativamente. Estes polímeros também são conhecidos por apresentar outras atividades biológicas, tais como antiviral, antitrombótica, anticoagulante, dentre outras. O uso de imunoestimulantes é importante na redução do impacto do estresse no cultivo intensivo de organismos aquáticos. O presente trabalho teve como objetivo purificar e avaliar a influência dos polissacarídeos sulfatados das macroalgas marinhas *Halymenia pseudofloresia*, *Caulerpa racemosa* e *Spatoglossum schroederii*, na sobrevivência de náuplios de *Artemia franciscana* submetidos a estresse salino. Os PS brutos foram previamente extraídos, através de digestão enzimática e estes foram fracionados em uma coluna de troca iônica de DEAE-celulose com diferentes concentrações de NaCl no tampão de extração, sendo as frações monitoradas através da atividade metacromática e presença de açúcar. Para avaliar o efeito imunoestimulante sobre os náuplios de *A. franciscana*, primeiramente, os cistos foram incubados em um béquer de 1L com água salgada, iluminação e aeração constante. Após a eclosão os animais foram transferidos com o auxílio de uma pipeta, para uma placa composta por 96 poços de 2 mL, na densidade de 10 náuplios mL⁻¹. O delineamento experimental constou de três tratamentos com quantidades crescentes de PS e um controle sem a adição de PS, com cinco repetições para cada tratamento. Os PS foram adicionados diretamente na água no momento do estresse salino, realizado através da exposição dos náuplios, durante quatro horas, à salmoura com salinidade de 200. Após este período, os animais vivos foram contados e as taxas de sobrevivência foram transformadas para arcoseno e submetidas a uma análise de variância e teste t para médias com 5% de significância estatística. O fracionamento em coluna de DEAE- celulose apresentou grande diferença no perfil metacromático entre os PS extraídos das distintas macroalgas. As taxas de sobrevivência foram significativamente superiores às obtidas no controle quando foram administradas as maiores doses, tanto para os PS brutos como para as frações da *H. pseudofloresia* e na dose intermediária da fração 0,7 M de NaCl da macroalga *C. racemosa*. Porém, na macroalga *S. schroederii* observou-se que as taxas de sobrevivência foram superiores com doses menores para os PS bruto e intermediárias com a fração de 0,5M de NaCl. Assim, os náuplios de *A. franciscana* apresentaram uma maior sobrevivência ao estresse salino na presença de PS bruto em doses maiores para a alga marinha vermelha *H. pseudofloresia*, e para a *S. schroederii* quando ministrada em doses menores. Entretanto, a macroalga marinha verde *C. racemosa* apresentou uma maior resistência em todas as doses quando foi utilizada a fração 0,9 M de NaCl.

Palavras chaves: Macroalgas, resistência, fracionamento

LISTA DE FIGURAS

| | | Pág. |
|----------|--|------|
| FIGURA 1 | Estrutura de um polissacarídeo sulfatado (Fucoidan) | 14 |
| FIGURA 2 | As algas marinhas <i>Caulerpa racemosa</i> (A), <i>Spatoglossum schroederi</i> (B) e <i>Halymenia pseudofloresi</i> (C). | 16 |
| FIGURA 3 | Gráfico da Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas pelo o extrato bruto da alga marinha vermelha <i>H. pseudofloresi</i> em coluna de DEAE-celulose | 19 |
| FIGURA 4 | Gráfico da Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas pelo o extrato bruto da alga marinha parda <i>S. schroederi</i> em coluna de DEAE-celulose | 20 |
| FIGURA 5 | Gráfico da Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas pelo o extrato bruto da alga marinha verde <i>C. racemosa</i> em coluna de DEAE-celulose | 21 |
| FIGURA 6 | Gráfico da Sobrevivência de náuplios de <i>artemia</i> submetidos a estresse salino na presença e ausência dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha <i>H. pseudofloresi</i> | 23 |
| FIGURA 7 | Gráfico da Sobrevivência de náuplios de <i>artemia</i> submetidos a estresse salino na presença e ausência dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda <i>S. schroederi</i> | 24 |
| FIGURA 8 | Gráfico da Sobrevivência de náuplios de <i>artemia</i> submetidos a estresse salino na presença e ausência dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde <i>C. racemosa</i> | 25 |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1.0 | INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1 | Algas marinhas | 9 |
| 1.2 | Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas | 10 |
| 1.3 | Atividade imunoestimulante | 11 |
| 2.0 | MATERIAIS E MÉTODOS | 14 |
| 2.1 | Caracterização das macroalgas estudadas | 14 |
| 2.2 | Obtenção dos polissacarídeos sulfatados das macroalgas marinhas | 15 |
| 2.3 | Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em coluna de troca iônica | 15 |
| 2.4 | Determinação do teor de açúcar nas frações | 15 |
| 2.5 | Resistência de náuplios de <i>Artemia franciscana</i> ao estresse salino na presença de polissacarídeos sulfatados | 16 |
| 2.6 | Análises estatísticas | 17 |
| 3.0 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 18 |
| 3.1 | Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em DEAE-celulose | 18 |
| 3.2 | Resistência dos nauplios de <i>A. franciscana</i> ao estresse salino | 22 |
| 4.0 | CONCLUSÃO | 28 |
| 5.0 | REFERÊNCIAS | 29 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Algas marinhas

As algas constituem um grupo diversificado de vegetais pertencentes ao grupo Protista e podem ser encontradas em ambientes marinhos ou continentais, sendo classificadas a partir das suas características morfológicas e fisiológicas. As algas desempenham importantes papéis tanto no meio ambiente abastecendo os ecossistemas de alimento e oxigênio, como também são riquíssimas fontes de produtos naturais (BICUDO; BICUDO, 1970).

As macroalgas marinhas habitam as regiões costeiras dos continentes, desde o limite da zona de maré até o fim da zona eufótica, aderidas geralmente a substratos rochosos. Desta forma apresentam uma estrutura complexa, pois possuem uma grande capacidade de sobreviver nestes ambientes, onde estão sujeitas, devido ao movimento das marés, a amplas flutuações de temperatura, umidade, salinidade e luz.

As macroalgas são classificadas em quatro grandes grupos: Cyanophyta (azuis), Chlorophyta (verdes), Phaeophyta (pardas ou marrons) e Rhodophyta (vermelhas). A divisão Chlorophyta se caracteriza pela presença de filamentos, presença de celulose na parede celular, ocorrência ou não de talo cenocítico, presença de pigmentos acessórios como os carotenóides, clorofilas a e b, e por possuir o amido como substância de reserva. As algas da divisão Phaeophyta se caracterizam por apresentarem grande quantidade de fucoxantina, clorofilas a e c, conter inclusões de alginato e fucoídano em sua parede celular celulósica e ter a laminarina como substância de reserva (JOLY, 1965). As algas da divisão Rhodophyta possuem clorofila a e d, pigmentos acessórios (ficobilinas), uma substância de reserva denominada “amido das florídeas” e a parede celular celulósica possui ágar, carragenana ou carbonato de cálcio em algumas espécies (BIRNER; UZUNIAN, 2006).

1.2. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas

Os carboidratos são moléculas orgânicas que apresentam o radical poliidroxialdeído ou poliidroxicetona em sua estrutura química, ocorrendo em todos os seres vivos, principalmente nos vegetais. Estes compostos estão divididos de acordo com o número de unidades de açúcares em três classes: monossacarídeos, oligossacarídeos (dissacarídeos e trissacarídeos) e polissacarídeos (NELSON; COX, 2006). Os polissacarídeos são constituídos por cadeias formadas por várias unidades de monossacarídeos, unidos por ligações glicosídicas, podendo ser lineares ou ramificadas (LEHNINGER et al., 1995).

Nas algas marinhas, a maioria dos polissacarídeos constituintes da matriz extracelular apresenta, em sua estrutura, uma grande quantidade de grupamentos sulfatos, sendo conhecidos como polissacarídeos sulfatados (PS) (Figura 1), que variam de espécie para espécie e, às vezes em diferentes partes da mesma alga (DIETRICH, 1995). A complexidade estrutural destes compostos se deve as muitas possibilidades de ligações entre os monossacarídeos e à distribuição dos grupamentos sulfato (ALVES, 2000). Estes polímeros, formados por unidades repetitivas de açúcares, são carregados negativamente devido à presença destes radicais (STYER, 1996). Sendo assim, cada polissacarídeo pode possuir uma conformação estrutural única e apresentar atividades biológicas diferentes e/ou mais potentes do que outros polissacarídeos já descritos (ROCHA et al., 2004).

Estas moléculas são encontradas amplamente no tecido conjuntivo dos vertebrados e em menor quantidade nos invertebrados (Cássaro; Dietrich, 1977), sendo também encontradas nas algas marinhas (Painter, 1983). No entanto, não são encontradas em plantas superiores, com exceção das gramíneas marinhas (AQUINO et al., 2005).

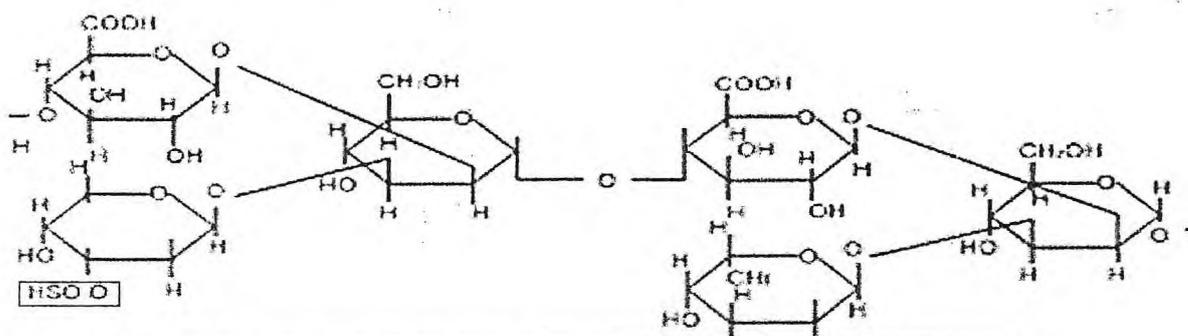


Figura 1: Estrutura molecular do polissacarídeo sulfatado do Fucoidan

Segundo Percival; McDowel (1967), os PS estão presentes nas algas marinhas pardas na forma de fucose sulfatada como a fucoidana, nas vermelhas como galactanas sulfatadas, representadas pelo ágar e carragenana e como arabino-galactanas nas algas verdes

Os polissacarídeos sulfatados apresentam uma grande importância comercial, tanto na indústria alimentícia, onde são utilizados na fabricação de sorvetes e produtos de leite pasteurizados, devido as suas propriedades gelatinizantes e espessantes, quanto na indústria farmacêutica na formulação de novas drogas, já que apresentam atividades biológicas, tais como, antibacteriana (CHOTIGEAT et al., 2004), antiviral (TALARICO et al., 2005), imunoestimulante (ZHOU et al., 2004), entre outras.

Diversos PS encontrados nas algas marinhas já foram estudados e caracterizados por diferentes pesquisadores. Entretanto, os principais estudos estão geralmente centralizados nas fucanas e nas galactanas sulfatadas pelo fato delas apresentarem atividades anticoagulante e antitrombótica, sendo essenciais para o desenvolvimento de novas drogas visando à substituição da heparina que possui vários efeitos adversos (PEREIRA et al. 1999; FARIAS et al., 2000).

Alguns trabalhos relatam outros tipos de atividade biológica dos PS de algas, como a fucoidana, extraída da alga marinha parda *Fucus vesiculosus*, que apresenta uma eficiente ação citotóxica e miotóxica contra o veneno das serpentes *Bothrops asper*, *Cerrophidion godemani*, *Atropoides nummifer* e *Bothreechis schlegeli* (ÂNGULO; LOMONTE, 2003).

1.3. Atividade imunoestimulante

A aquicultura é um dos setores da produção de alimentos que se encontra em crescimento significativo e exerce um importante papel no suprimento da demanda por proteína de origem animal para a alimentação humana, além de gerar milhões de empregos em países em desenvolvimento. Porém o surgimento de enfermidades nos cultivos, principalmente as de origem viral, tem se tornado um obstáculo para a sua expansão.

No decorrer dos últimos anos, tem crescido o interesse científico na investigação e identificação de compostos oriundos de organismos aquáticos que apresentem atividades biológicas, os quais têm sido empregados em vários ramos da ciência. Dentre estes compostos, podemos citar os imunoestimulantes que vêm sendo avaliados em pesquisas com organismos aquáticos e têm apresentado resultados promissores, principalmente no aumento da sobrevivência de crustáceos expostos a patógenos, como parasitas, fungos, bactérias e vírus, que afetam a produção desses organismos e causam grandes perdas econômicas (SMITH et al., 2003).

Segundo Sakai (1999), fatores nutricionais como as vitaminas B e C e hormonais, como a prolactina, também vem sendo utilizados como imunoestimulantes para aumentar a sobrevivência dos peixes e camarões em situações adversas.

Substâncias imunoestimulantes podem ser obtidas a partir de produtos naturais, como também por síntese química, com base na estrutura molecular dos próprios produtos naturais. Dentre estes compostos, muitos são derivados de microorganismos ou de micro e macroalgas (CANTELLI, 2009).

Segundo Smith et al (2003), os principais compostos ativos já descritos na literatura como sendo capazes de gerar imunoestimulação em crustáceos são os carboidratos, tais como β -glicanas, lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanas (PGs) e polissacarídeos sulfatados (PS).

Lima (2007) relatou a eficiência de um PS extraído da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* no aumento da resistência de juvenis e pós-larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* submetidos a diferentes condições de estresse.

Rodrigues (2006) demonstrou a eficácia da administração do PS extraído da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresii* na sobrevivência de camarões *L. vannamei* submetidos a uma condição de estresse causada pela suspensão das trocas parciais de água durante o cultivo, sugerindo um possível efeito imunoestimulante.

Os PS extraídos da macroalga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* foram adicionados na ração de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, submetidas à reversão sexual, sendo observado um melhor crescimento dos indivíduos que receberam determinada dose (FARIAS et al., 2004). Estes mesmos polissacarídeos também aumentaram a sobrevivência de juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei*, infectados com o vírus da

mionecrose infecciosa (COSTA et al., 2006) e de pós-larvas da mesma espécie de camarão, submetidas às condições de estresse (BARROSO et al., 2007).

Estudos demonstram que os PS de algas marinhas podem também ser utilizados para melhorar a produção na aqüicultura, prevenindo os efeitos indesejados do estresse nos organismos aquáticos, como em ARAÚJO (2006) que introduziu na alimentação de pós-larvas de *O. niloticus* os PS da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata*, resultando no aumento da resistência dos peixes a condições estressantes causadas pela falta de oxigênio e má qualidade de água.

Moreira (2007) relatou que a administração dos PS extraídos da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta* reduziu a mortalidade de pós-larvas e juvenis do camarão marinho *L. vannamei* havendo um aumento significativo na resistência das mesmas as condições estressantes do cultivo.

Estudos com o extrato bruto de fucoidana extraída da alga marinha parda *Sargassum polycystum* revelaram uma redução no impacto causado pela síndrome do vírus da mancha branca no camarão *Penaeus monodon*, após a inclusão dos PS na dieta dos camarões por via oral. Além disso, observou-se que o polímero também foi capaz de inibir as infecções causadas por *Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e, conseqüentemente, resultou em um aumento significativo na taxa de sobrevivência dos animais (CHOTIGEAT et al., 2004).

A atividade imunoestimulante da farinha da alga marinha parda *Macrocystis pyrifera* foi avaliada após sua adição na ração para alimentação de camarões e após 25 dias de cultivo, as dietas compostas com 15 e 20% de farinha de algas estimularam o consumo alimentar desses animais (RIVERA et al., 2002).

Portanto a utilização de PS de algas marinhas em organismos aquáticos como possíveis imunoestimulantes é uma importante ferramenta para aumentar a resistência aos patógenos e durante outras situações de estresse (BRICKNELL et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo purificar os polissacarídeos sulfatados das macroalgas marinhas *Caulerpa racemosa*, *Halymenia pseudofloresi*, e *Spatoglossum schroederi* e avaliar os seus efeitos na resistência de nauplios de artêmia submetidos a um estresse salino.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Caracterização das macroalgas estudadas

A alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Figura 2A) pertence à família Caulerpaceae e é constituída por uma porção estolonífera, fixada ao substrato através de ramos rizoidais e por uma porção ereta de onde partem ramos curtos em forma cilíndrica com terminações um pouco esféricas. Na região basal, destacam-se estolões grossos aderidos ao substrato por ramos finos (JOLY, 1965).

A alga parda *Spatoglossum schroederi* (Figura 2B) pertence à família Dictyotaceae, da ordem Dictyotales e apresentam ramificações repetidamente alternadas podendo ser dicotômicas, sub-dicotômicas ou lobadas (TAYLOR, 1960). Apresenta um talo fixado ao substrato por massa rizoidal, ereto, foliáceo em forma de fita larga com suas margens onduladas ou serrilhadas (JOLY, 1965).

A alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresi* (Figura 2C) pertence à família Halymeniaceae, da ordem Halymeniales e é encontrada, em grande parte, arribada nas praias dos mares tropicais. Esta alga apresenta um talo foliáceo, podendo ser inteiro, lobulado ou ramificado com uma consistência gelatinosa ou carnosa flexível. Sua estrutura medular contém filamentos delgados bem separados em uma camada gelatinosa (TAYLOR, 1960).



A



B



C

Figura 2: As algas marinhas *Caulerpa racemosa* (A), *Spatoglossum schroederi* (B) e *Halymenia pseudofloresii* (C). Fonte: www.algaebase.com.org e arquivo pessoal de Paula Cristina W. Camargo Lima.

2.2. Obtenção dos polissacarídeos sulfatados das macroalgas marinhas

Os polissacarídeos sulfatados (PS) das macroalgas marinhas *H. pseudofloresii* (vermelha) *C. racemosa* (verde) e *S. schroederi* (parda), coletadas nas praias de Fleicheiras e Pacheco, Ceará. Foram obtidos do Laboratório de Bioquímica Marinha (BIOMAR), onde os mesmos foram previamente extraídos através de digestão enzimática, de acordo com RODRIGUES (2005) para a *C. racemosa*, *H. pseudofloresia* (RODRIGUES, 2006), e para a *S. schroederi* (LIMA, 2007).

2.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em coluna de troca iônica

Os PS brutos foram submetidos a uma cromatografia de troca iônica em uma coluna de DEAE-celulose acoplada a um coletor de frações. A coluna foi inicialmente equilibrada com tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 + EDTA 5 mM + cisteína 5 mM e o fluxo foi

mantido em 1 mL/min, sendo coletadas frações de 1 mL. Em todas as cromatografias, foi aplicada, no topo do gel, uma alíquota de 1 mL de uma solução de PS (1 mg/mL) e a eluição da coluna realizou-se, passo a passo, com diferentes concentrações de NaCl (0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0 M) preparadas no mesmo tampão de equilíbrio. A eluição dos PS da coluna foi monitorada através da reação metacromática com o azul-dimetil-dimetileno (DMB) utilizando um espectrofotômetro na absorvância a 525 nm. A eluição obtida foi utilizada direto para o estresse salino.

2.4 Determinação do teor de açúcar nas frações

A presença de açúcar nas frações coletadas da coluna de troca iônica foi detectada de acordo com Dubois et al. (1956). Para isso, foram adicionados 50 µL de cada fração em 350 µL de água destilada, seguidos de 20 µL de fenol redestilado a 5% e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, sendo a mistura homogeneizada em vórtex e incubada por 30 minutos na temperatura ambiente. Após o período de incubação, a mistura foi levada ao espectrofotômetro para realizar a leitura a 490 nm.

2.5 Resistência de náuplios de *Artemia franciscana* ao estresse salino na presença de polissacarídeos sulfatados

Para a obtenção dos náuplios de *A. franciscana* foi realizada, inicialmente, a hidratação dos cistos em água doce por 1 hora. Após esse período, os cistos foram descapsulados, durante 30 segundos, através de um banho com hipoclorito de sódio (água sanitária) em uma tela de 60 micra, sendo em seguida lavados abundantemente com água corrente na própria tela, até a completa eliminação do odor da base. Posteriormente, os cistos foram incubados por 24 h em água com salinidade 35, em um béquer de 1L com iluminação e aeração constantes. Após a eclosão, os náuplios foram transferidos, com o auxílio de uma pipeta, para uma placa composta por 96 poços com um volume de 2 mL, na densidade de 10 náuplios/mL. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e constou de três



tratamentos com quantidades crescentes de PS e um controle sem a adição de PS. Para isso, foram utilizados tanto os PS brutos, como as frações purificadas na cromatografia de troca iônica, sendo utilizadas cinco repetições para cada tratamento. Os PS foram adicionados diretamente na água no momento do estresse salino, que foi realizado através da exposição dos náuplios, à salmoura com salinidade 200 e feita a contagem dos náuplios de hora em hora, até os náuplios do controle morrerem no mínimo a metade (DL 50), o qual sucedeu em quatro horas. Após este período, os animais vivos foram contados para a determinação das taxas de sobrevivência.

2.6. Análises estatísticas

As taxas de sobrevivência dos náuplios expostos ao estresse salino na presença dos PS das algas marinhas foram transformadas para arcoseno, submetidas a uma análise de variância de fator único (ANOVA) e, no caso de diferença significativa, ao teste t para médias com 5% de significância estatística.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em DEAE- celulose

A cromatografia em DEAE-celulose dos polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha vermelha *H. pseudofloresi* (Figura 3) apresentou três frações eluídas nas concentrações de 0,7; 0,9 e 1,2 M de NaCl. Estas frações apresentaram um perfil metacromático semelhante, revelando elevadas atividades metacromáticas com maior teor de açúcar nas frações eluídas com 0,7 e 1,2 M de sal.

Rodrigues (2006) fracionou os PS das algas marinhas vermelhas *Halymenia sp* e *H. pseudofloresi*, encontrando quatro e cinco frações, respectivamente. A quantidade de frações obtida da coluna de troca iônica também vai depender das concentrações de sal utilizadas na eluição da coluna. Desta forma, as algas do gênero *Halymenia* apresentam elevadas concentrações de PS, independente da concentração de sal utilizada na eluição da coluna de troca iônica.

Pontes (2005) purificou os PS da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* em quatro frações (1,2; 1,4; 1,6; 1,8 M de NaCl), também em DEAE-celulose, e observou uma elevada presença de açúcar nas frações eluídas com as maiores concentrações de sal (1,4; 1,0 e 1,8 M). Entretanto, Torres (2005) mostrou que o fracionamento da alga marinha vermelha *Champia feldmannii* apresentou quatro picos com maiores concentrações de açúcar nas primeiras frações, principalmente nas eluídas com concentrações 0,7 e 1,2 M de NaCl, sendo bastante semelhante ao presente trabalho.

A purificação dos PS extraídos da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*, cultivada em dois meios diferentes (ambiente natural e em um sistema integrado), revelou que a alga do ambiente natural apresentou seis frações eluídas nas concentrações 0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4 e 1,6 M de NaCl e que da alga do cultivo integrado foram obtidas apenas três frações (0,5; 0,7 e 1,6

M de NaCl). No entanto, independente da origem da alga, a maior atividade metacromática e teor de açúcar foi sempre observada na fração eluída em 0,7 M de NaCl (com. pess.).

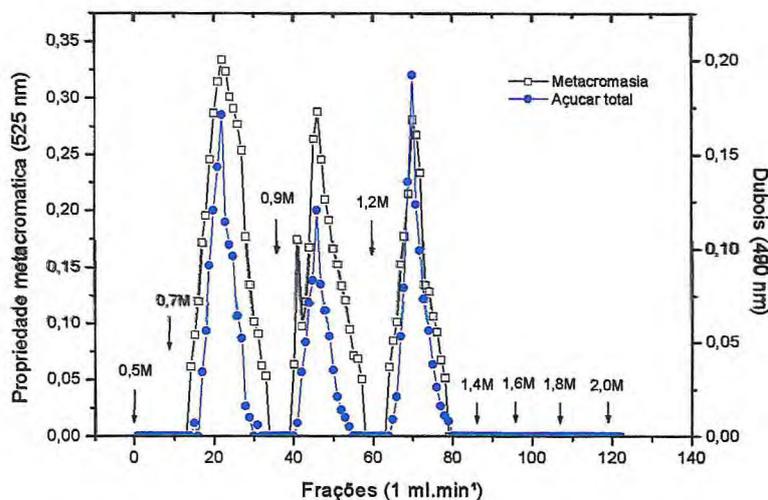


Figura 3: Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas no fracionamento do extrato bruto de PS extraídos da alga marinha vermelha *H. pseudofloresii* em coluna de DEAE-celulose.

Com relação ao fracionamento dos PS da alga marinha parda *S. schroederi* (Figura 4) observou-se a presença de apenas uma fração eluída na concentração de 0,5 M de NaCl, não sendo obtida nenhuma outra fração em concentrações mais elevadas do sal. Analisando a relação entre metacromasia e a presença de açúcar, podemos observar uma elevada atividade metacromática, sendo praticamente semelhante ao teor de açúcar. Lima (2007) que fracionou os PS desta mesma espécie e no mesmo tipo de coluna relatou um perfil metacromático bem diferente do encontrado no presente trabalho, sendo obtidos de três a quatro picos, dependendo do número de extrações. Entretanto, a fração eluída com 0,5 M de NaCl apresentou a maior metacromasia e teor de açúcar em todas as extrações, sendo semelhante ao resultado do presente trabalho. Podemos sugerir que essa diferença significativa no número de frações obtidas, possa estar relacionada com a sazonalidade, ou seja, a espécie deve ter sido coletada em períodos diferentes o que pode ter influenciado na produção de PS pela alga. Em estudos anteriores com a alga *S. schroederi*, os PS foram fracionados por Leite et al. (1998) através de cromatografia de troca iônica, utilizando 0,15; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 M de NaCl. Segundo os autores, a concentração de açúcar diferiu significativamente entre as

frações, entretanto, como no presente trabalho, o pico com maior conteúdo de açúcar total foi na fração eluída com 0,5 M de NaCl.

Alencar (2007) relata que o fracionamento dos PS extraídos da alga parda marinha *Lobophora variegata* resultou em seis frações, eluídas nas concentrações 0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4 e 1,6M de NaCl. As maiores quantidades de açúcar e metacromasia sempre foram observadas nas frações 0,5 e 0,7 M de NaCl. Nonato (2009) extraiu e purificou os PS de duas espécies de algas marinhas pardas, *Padina gymnospora* e *Padina sp*, obtendo na primeira seis frações eluídas nas concentrações 0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4 e 1,6 M de NaCl e, na segunda, apenas três (0,5; 0,7 e 1,2M de NaCl). No entanto, nos dois fracionamentos, as maiores atividades metacromáticas e teores de açúcar também foram observadas nas primeiras frações, principalmente na fração eluída com 0,5 M de NaCl.

A purificação dos PS extraídos da alga marinha parda *Sargassum filipendula* resultou em seis frações eluídas nas concentrações de sal de 0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4 e 1,6 M de NaCl, apresentando nas primeiras frações altos teores de açúcar e metacromasia, principalmente nas frações 0,5 e 0,7 M, semelhantes aos resultados do presente trabalho (com. pess.). Portanto, podemos sugerir que os PS de algas pardas possuem pouca carga, sendo eluídos em grandes quantidades com baixas concentrações de sal em colunas de troca iônica.

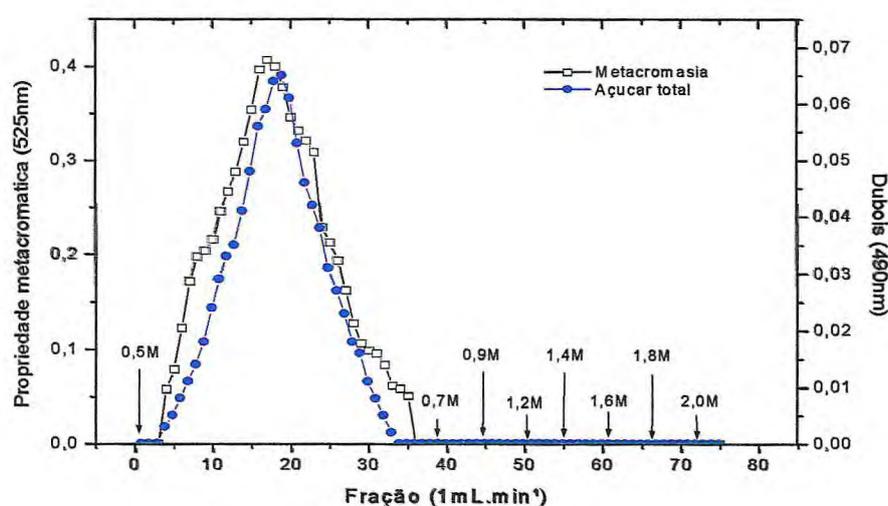


Figura 4: Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas no fracionamento do extrato bruto de PS extraídos da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* em coluna de DEAE-celulose.

A figura 5 mostra o perfil metacromático e teor de açúcar das frações obtidas no fracionamento do extrato bruto de PS da alga marinha verde *C. racemosa*, onde observa-se a presença de cinco frações eluídas nas concentrações de 0,5; 0,7; 0,9; 1,2 e 1,4 M de NaCl, não sendo eluída nenhuma fração com 1,6; 1,8 e 2,0 M de NaCl. A fração eluída com 0,7 M de NaCl apresentou a maior atividade metacromática, seguida das frações obtidas com 0,5 e 1,2 M de sal. Na determinação da concentração de açúcar, todas as frações apresentaram um baixo teor, exceto a fração eluída com 1,4 M de NaCl que apresentou elevado teor de açúcar e atividade metacromática.

Rodrigues (2005) verificou no fracionamento da alga *C. racemosa* a presença da atividade metacromática em todas as frações eluídas com NaCl, bem como a presença de açúcar. Além disso, a fração eluída com 0,7 M de NaCl também apresentou a maior atividade metacromática. Semelhante ao resultado do presente trabalho que apresentou na fração eluída com 0,7M sua maior atividade metacromatica, porém não foram eluídas frações com concentrações mais elevadas de sal (1,8 a 2,0 M).

Em estudos relacionados à extração e purificação dos PS da alga marinha verde *C. sertularioides* foram isoladas seis frações, eluídas da coluna de troca iônica nas concentrações 0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4 e 1,6 M de NaCl. Em todas as extrações notou-se que a fração eluída com 0,9 M de sal apresentava a maior quantidade de sulfato e um baixo teor de açúcar (BEZERRA-NETO, 2005).

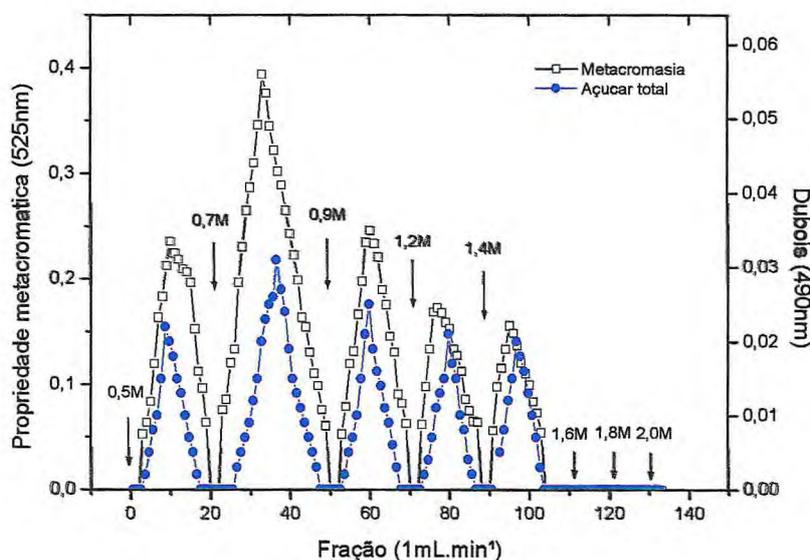


Figura 5: Atividade metacromática e presença de açúcar nas frações obtidas no fracionamento do extrato bruto de PS extraídos da alga marinha verde *C. racemosa* em coluna de DEAE-celulose.

3.2. Resistência dos náuplios de *Artemia franciscana* ao estresse salino

A resistência dos náuplios de artêmia ao estresse salino na presença dos PS brutos e frações purificadas da alga marinha vermelha *H. pseudofloresi* (Figura 6) não apresentou diferença do controle nas doses de 0,5 e 1,0 mg/L. No tratamento contendo a dose intermediária (1,0 mg/L) observou-se que a sobrevivência dos náuplios expostos à fração 0,9 M foi significativamente superior à obtida nas outras frações, mas não diferiu do controle. Por outro lado, quando os náuplios foram expostos a maior dose dos PS (2,0 mg/L) foi observado um aumento significativo na sobrevivência dos náuplios, tanto com os PS brutos como com as frações. As sobrevivências dos náuplios que absorveram os PS brutos e as frações 0,7 e 0,9 M de NaCl não diferiram estatisticamente entre si, mas foram significativamente superiores ao controle e, durante a exposição dos mesmos à fração 1,2 M. Desta forma, podemos afirmar que a resistência dos náuplios aumentou significativamente quando foram administradas as doses maiores, tanto dos PS brutos como das frações purificadas em DEAE-celulose.

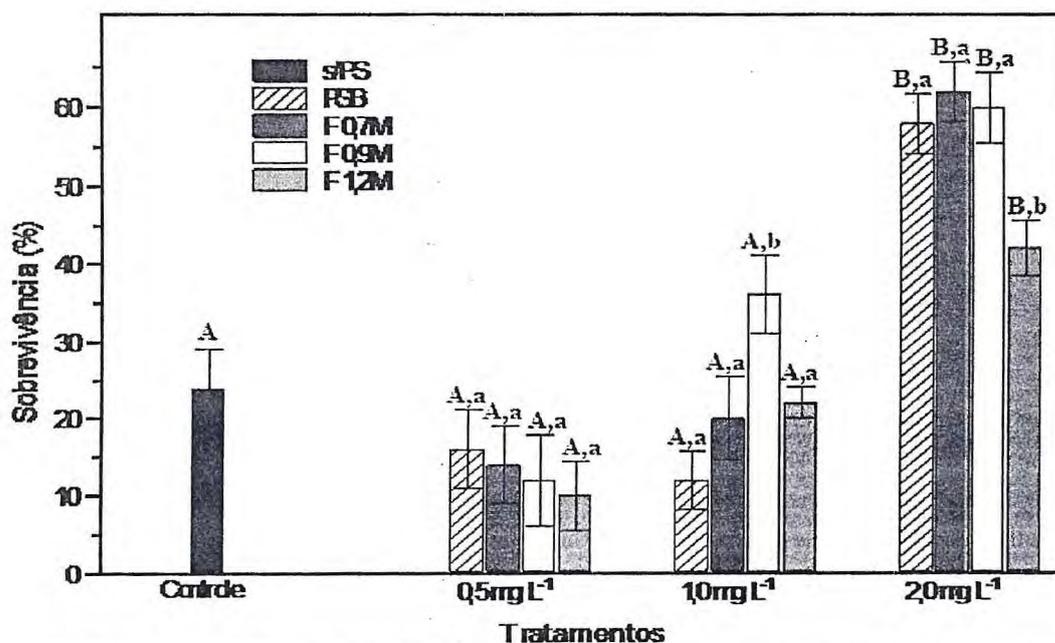


Figura 6: Sobrevivência de náuplios de artêmia submetidos a estresse salino na presença e ausência dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *H. pseudofloresi*. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferença estatística dos tratamentos para o controle. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferença estatística dentro dos tratamentos.

A exposição dos náuplios de artêmia à menor dose (0,5 mg/L) dos PS brutos da alga marinha parda *S. schroederi* (Figura 7) resultou em um significativo aumento da sobrevivência, no entanto, nas maiores doses este efeito foi abolido. Por outro lado, quando os mesmos foram expostos à fração 0,5 M a menor dose não conferiu nenhuma resistência ao náuplios, enquanto na dose de 1,0 mg/L, a sobrevivência foi significativamente superior ao controle e semelhante à observada para os PS brutos na dose mais baixa. No entanto, este efeito foi abolido na dose mais elevada (2,0 mg/L). Desta forma, a sobrevivência dos náuplios de *A. franciscana* apresentou os melhores resultados quando foi utilizada a menor dose dos PS brutos, sugerindo uma dose dependente. Entretanto, para a fração 0,5 M verificou-se a existência de uma dose ótima (1,0 mg/L) para um significativo aumento da sobrevivência dos náuplios.

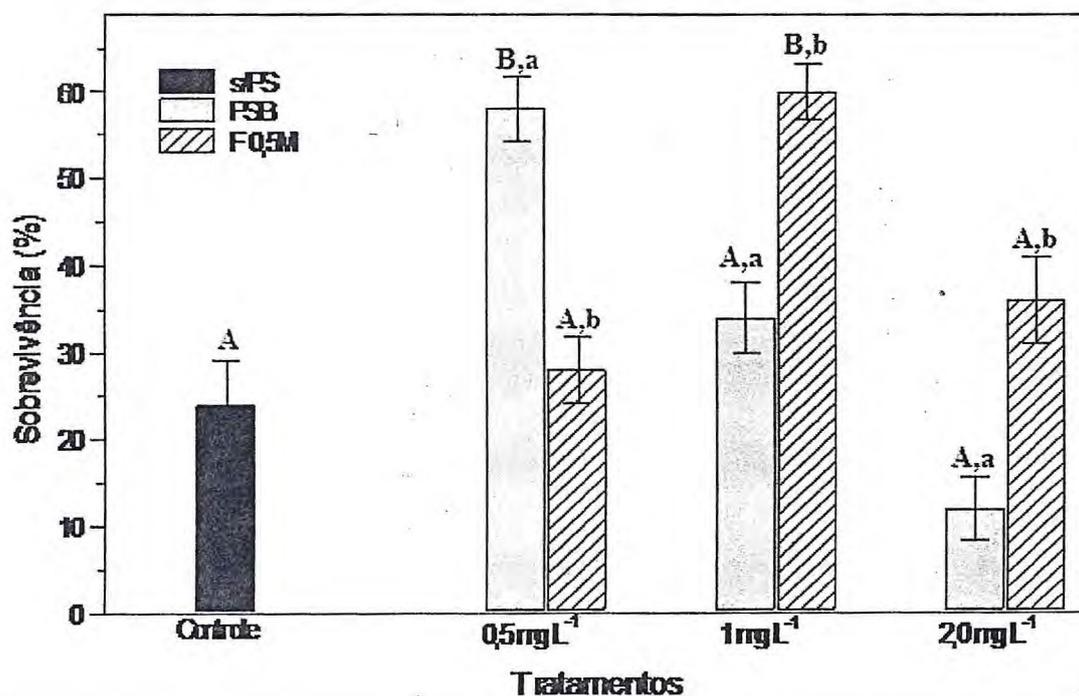


Figura 7: Sobrevivência de náuplios de artêmia submetidos a estresse salino na presença e ausência dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *S. schroederi*. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferença estatística dos tratamentos para o controle. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferença estatística dentro dos tratamentos.

A administração dos PS da alga marinha verde *C. racemosa* (Figura 8) na dose de 0,5 mg/L de uma maneira geral não diferiu do controle, com exceção das frações 0,7 e 0,9 M. Observou-se ainda que, nesta dose, a exposição à fração 0,9 M resultou numa sobrevivência significativamente superior quando comparada à observada na administração da fração 0,7 M que, por sua vez, não diferiu do controle. Quando os PS desta espécie foram administrados na dose intermediária de 1,0 mg/L, observamos que somente a sobrevivência dos náuplios expostos à fração 1,4 M não diferiu do controle. Neste caso, a exposição aos PS brutos e à fração 0,9 M também foram superiores aos efeitos positivos das outras frações. Mas foi na exposição à fração 0,9 M que se observou a mais elevada taxa de sobrevivência. Nos tratamentos em que foram administradas as doses mais elevadas de PS (2,0 mg/L) observou-se que apenas os PS brutos e as frações 0,5 e 0,9 M continuaram a conferir resistência após o estresse salino. Os náuplios expostos aos PS brutos e a fração 0,9 M apresentaram as maiores taxas de sobrevivência, ou seja, uma maior resistência após o estresse salino e ambas não diferiram estatisticamente entre si. No entanto, pode-se observar uma redução no efeito positivo da fração 0,9 M, enquanto o efeito foi aumentado quando se utilizou os PS brutos nesta maior dosagem. Assim, podemos afirmar que as maiores taxas de sobrevivência foram obtidas após a administração dos PS brutos e da fração 0,9 M, porém o aumento da dose para 2,0 mg/L resultou na redução do efeito positivo da fração o que não ocorreu no caso dos PS brutos que teve seu efeito aumentado.

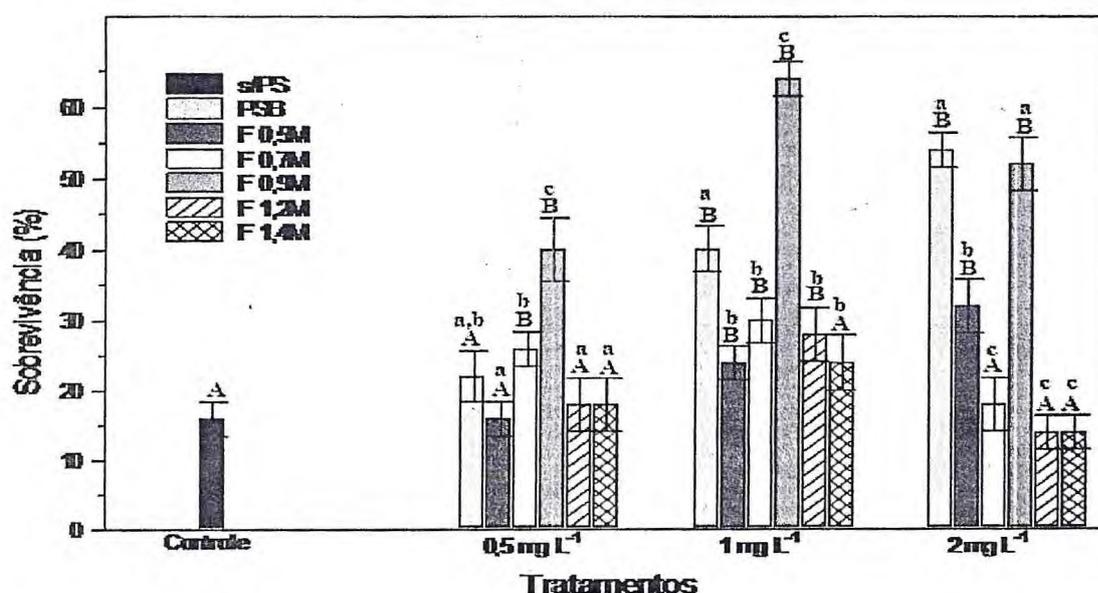


Figura 8: Sobrevivência de náuplios de artêmia submetidos a estresse salino na presença e ausência dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *C. racemosa*. Letras maiúsculas diferentes sobre as barras indicam diferença estatística dos tratamentos para o controle. Letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam diferença estatística dentro dos tratamentos.

Estudos envolvendo imunostimulantes na aquicultura se traduzem como a melhor ferramenta para aumentar a sobrevivência de camarões (AZAD et al., 2005). O uso de polissacarídeos sulfatados em cultivos experimentais vem reduzindo o estresse sofrido por peixes e camarões. Barroso et al. (2007) observaram que pós-larvas do camarão marinho *L. vannamei* imersas em determinada concentração dos PS brutos da alga marinha vermelha *B. occidentalis* ficaram mais resistentes ao manejo, aumentando a taxa de sobrevivência no final do experimento. A administração de 1,0 mg/L dos PS brutos extraídos da alga marinha vermelha *G. birdeae*, proveniente do ambiente natural, a náuplios de artêmia submetidos a um estresse salino resultou em um significativo aumento da sobrevivência dos mesmos. No entanto, quando foram utilizados os PS extraídos da mesma alga submetida a um cultivo integrado no laboratório, o mesmo efeito só foi observado com a duplicação da dose para 2,0 mg/L (com. pess.).

Rodrigues (2006) relatou um aumento significativo na sobrevivência de camarões *L. vannamei* submetidos a um banho de imersão com 1,0 mg/L dos PS brutos da alga *H. pseudofloresi* durante o período de estresse realizado através da supressão da renovação da água dos cultivos.

De acordo com Rodrigues et al. (2009), a adição de diferentes doses de PS brutos extraídos da alga marinha parda *Lobophora variegata* na água de cultivo de alevinos revertidos de tilápia (*Oreochromis niloticus*), submetidos a diferentes salinidades, não surtiram efeitos na taxa de sobrevivência dos animais. Araújo (2006) administrou os PS brutos extraídos da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* em pós-larvas de tilápias *O. niloticus* submetidas à reversão sexual e observou que os peixes apresentaram maior sobrevivência quando expostos a dosagem de 1,0 mg/L.

Alguns trabalhos relatam a eficiência da administração dos PS extraídos das algas marinhas no aumento da resistência dos camarões em situações de estresse ou de contaminação por patógenos, sendo, mais uma ferramenta na prevenção de doenças infecciosas. De acordo com Chotigeat et al. (2004), após a administração oral do fucoidam extraído da alga parda *Sargassum polycystium*, foi verificado um aumento da sobrevivência do camarão negro *Penaeus monodon* infectado pelo vírus causador da mancha branca (WSSV). Maiores taxas de sobrevivência também foram observadas por Huang et al. (2006) em camarões *Fenneropenaeus chinensis*, infectados pela bactéria *Vibrio harveyi*, quando alimentados com dietas suplementadas com estes mesmos PS. Fu et al. (2007) utilizaram

diferentes vias (oral, imersão e injeção) para administrar os PS da alga marinha vermelha *Gelidium amansii* em camarões *L. vannamei* infectados com a bactéria *Vibrio alginolyticus*. A administração por via oral resultou no melhor resultado contra a infecção pelo patógeno. Lima (2007) relatou que administração dos PS da alga parda *S. schroederi* a juvenis de *L. vannamei*, via imersão, resultou em uma maior resistência dos animais no tratamento com a dose de 2,0 mg/L.

Segundo Tinman et al. (2000), híbridos de tilápia (*O. aureus* x *O. niloticus*) infectados com *Streptococcus difficile* e alimentados com ração suplementada com peptídeo glucano, nas doses mais baixas, apresentaram uma melhor sobrevivência. Itami et al. (1998) relatou que o uso de polissacarídeos não sulfatados, como os β -glucanos, também é capaz de reduzir o estresse em camarões, *Penaeus japonicus*, em diversas fases de crescimento. Os autores observaram um aumento significativo nas taxas de sobrevivência dos camarões quando o glucano foi administrado por um período mais prolongado. Park; Jong (1996) administrou, via oral, β -glucanos em tilápias, *O. niloticus*, melhorando a taxa de crescimento em relação ao controle sem a presença do polissacarídeo. De acordo com Farias et al. (2004) a incorporação das D-galactanas sulfatadas obtidas da alga marinha vermelha *B. occidentalis* na ração de tilápias do Nilo, durante o processo da reversão sexual utilizando alta densidade de estocagem como fator estressante, resultou em um aumento significativo no peso dos peixes quando foi administrada a dose de 0,1mg/L. De acordo com Cantelle (2009) que avaliou o efeito dos PS da macroalga *Gracilaria birdiae* incorporados na ração de camarões *L. vannamei* infectados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), foi observado um aumento significativo no consumo alimentar, resultando no aumento de peso dos camarões.

Alguns trabalhos relatam também um efeito positivo na administração de PS extraídos de microalgas. Moreira (2010), após avaliar o efeito dos PS's extraídos da microalga *Dunaliella tertiolecta* como imunoestimulante em juvenis e pós-larvas do camarão marinho *L. vannamei*, evidenciou maiores valores na taxa de sobrevivência das pós-larvas administradas com as doses menores (0,5 mg/L), enquanto para os juvenis o melhor efeito foi observado na dose maior (2,0 mg/L) aumentando, portanto, a resistência dos animais. O efeito imunoestimulante da administração da microalga *Spirulina plantesis*, na dieta de carpas comuns, *C. carpio*, já foi comprovado através de um aumento das defesas não específicas dos animais (WATANUKI et al., 2006).

Diante do exposto, a utilização de nauplios de artêmia em ensaios para avaliar o efeito de PS de algas marinhas na resistência ao estresse é uma maneira prática e rápida de selecionar espécies que produzem moléculas com maior potencial para o uso na aquicultura, já que a utilização de animais adultos é sempre mais trabalhosa e requer mais espaço, pois o número de réplicas é fundamental para a aplicação de uma boa análise estatística. Os resultados mostraram que os PS são capazes de aumentar a resistência destes animais. Este feito é diferente quando se usa polímeros extraídos de algas diferentes. Além disso, dependendo da espécie, o efeito pode ser melhor com os PS brutos e/ou com as frações purificadas. A utilização de placas com poços de 2 mL e nauplios de artêmia permitem, mesmo em pequena escala, utilizar um bom número de repetições e, conseqüentemente, obter resultados mais confiáveis.

4. CONCLUSÃO

Após a realização deste trabalho, conclui-se que a utilização da coluna de DEAE-celulose foi eficiente na separação de diferentes frações presentes no extrato bruto de polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas marinhas.

Em relação à taxa de sobrevivência dos náuplios submetidos ao estresse salino, o efeito protetor da adição dos PS das macroalgas sugere possíveis resultados de imunestimulação, os quais dependem da espécie utilizada, da dose administrada e também do grau de purificação destas moléculas.

5. REFERÊNCIAS

ALENCAR, D. B. **Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora Variegata***. 2007. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

ALVES, L. G. **Polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha *Sargassum vulgare***. 2000. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Bioquímica) Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2000.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Inhibitory effect of fucoidan on the activities of crotaline snake venom myotoxic phospholipases A(2). **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.66, n.10, p. 1993-2000, Nov 2003.

AQUINO, R.S; LANDEIRA-FERNANDEZ, A.M; VALENTE, A.P; ANDRADE, L.R; MOURÃO, P.A.S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, Cary, v.15, n.1, p. 11-20, jan 2005.

ARAÚJO, G. S. **Efeito imunoestimulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* na reversão sexual de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1766) em condições adversas**. 2006. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

AZAD, I.S.; PANIGRAHI, A.; GOPAL,C.; PAULPANDI, S.; MAHIMA, C.; RAVICHANDRAN, P. Routes of immunostimulation vis-à-vis survival and growth of *Penaeus monodon* postlarvae. **Aquaculture**, v.248, p.227-234, 2005.

BARROSO, F.E.C.; RODRIGUES, J.A.G.; TORRES, V.M.; SAMPAIO, A.H.; FARIAS, W.R.L. Efeito do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* nas pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v.38, n.1, p.58-63, Mar 2007.

BEZERRA-NETO, J.T.B. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides***. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

BICUDO, C. E. M.; BICUDO, R. M. T. **Algas de águas continentais brasileiras**. p. 228, 1970.

BIRNES, E.; UZUNIAN, A. Reino protista: protozoários, algas, mixomicetos e oomicetos. In: _____. **Biologia II**. 3° ed. São Paulo: Harbra, 2005, p. 103-114.

BRINCKNELL, I.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v.19, n.5, p. 457-472, nov 2005.

CANTELLI, L. **Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria birdiae* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)**. 2007. Dissertação (Pós-graduação em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CASSARO, C.M.F.; DIETRICH, C.P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.252, n.7, p.2254-2261, 1977.

CHOTIGEAT, W.; TONGSUPA, S.; SUPAMATAYA, K.; PHONGDARA, A. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v.233, p.23-30, 2004.

COSTA, F.H.F.; FARIAS, W.R.L.; SAMPAIO, A.H.; SAKER-SAMPAIO, S. ROCHA, I.R. C.B.; PONTES, G.C.; SILVA, C.M.; SILVA-NETO, J.F.; SILVA, F.L.S.; NUNES, E.V.; SOUZA, A.L.F.; LIMA-JÚNIOR, T.B. 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*. In: **FEIRA NACIONAL DE CAMARÃO**, 2006. 1 CD-ROOM.

DIETRICH, C.P.; FARIAS, G.G.M.; ABREU, L.R.D.; LEITE, E.L.; SILVA, L.F.; NADER, H.B.; A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**, v.108, p.143-153, 1995.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.J.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, Washington, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

FARIAS, W.R.L.; REBOUÇAS, H.J.; TORRES, V.M.; RODRIGUES, J.A.G.; PONTES, G.C.; SILVA, F.H.O.; SAMPAIO, A.H. Enhancement of growth in tilapia larvae (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from the red marine algae *Botryocladia occidentalis*. **Revista Ciência Agronômica**, v.35, Número Especial, p. 189-195, Out 2004.

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 algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n° 88, p. 29299-29307, 2000.

FU, Y.W.; HOU, W.Y.; YEH, S.T.; LI, C.H.; CHEN, J.C.; The immunoestimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administration on shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**. v.22, n.6, p.673-685, 2007.

ITAMI, T; ASANO, M; TOKUSHIGE, K; KUBONO,K; NAKAGAWA, A; TAKENO, N; NISHIMURA, H; MAEDA, M; KONDO, M; TAKAHASHI, Y. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium termophilum*. **Aquaculture**. Amsterdã, v. 164, p. 277-288, 1998.

JOLY, A.B. **Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas**. São Paulo, 1965.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. **Princípios da bioquímica**. 2° ed. São Paulo: Sanvier, 1995.

LEITE, E.L; MEDEIROS, M.G.L; ROCHA, H.AO; FARIAS, G.G.M; SILVA, L.F; CHAVANTE, S.F; ABREU, L.D; DIETRICH, C.P; NADER, H.B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xycofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schroederi*. **Plant science**, v. 132, p.215-228, 1998.

LIMA, P. C. W. de C. **Efeito da administração dos polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* em juvenis e pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*.** 2007. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

MOREIRA, R. T. **Avaliação do efeito dos polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga *Dunaliella tertiolecta* como imunostimulante em juvenis de camarão *litopenaeus vannamei*.** 2010. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

NONATO JUNIOR, R. **Utilização dos polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas do gênero *Padina* (ADANSON, 1763) como ferramenta de diferenciação de espécies.** Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

OLIVEIRA, M. A. C. **Cultivo da microalga *Dunaliella sp.* em laboratório: extração e purificação de polissacarídeo sulfatados.** Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. In: _____. **The polysaccharides.** New York: Academic Press, v.2, 1983, p. 195,

PARK, H.H; JEONG, H.D. Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* in tilapia (*O. niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharidae. **Aquaculture**, Amsterdã, v. 143, n.3, p. 135-143, 1996.

PERCIVAL, E.; MCDOWELL, R. H. **Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides.** New York: Academic Press, 1967.

PEREIRA, M.S., MULLOY, B., MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucan: comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 12, p. 7656-7667, Mar 1999.

- PONTES, G. C. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis***. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- RAVEN, P.H; EVERT, R.F; EICHHORN, S. E. Protista II: Heterocontas e algas verdes. In: _____. **Biologia Vegetal**. 6º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p.356-383.
- ROCHA, H.A.O.; FARIAS, E.H.C.; BEZERRA, L.C.L.M.; ALBUQUERQUE, I.R.L.; MEDEIROS, V.P.; QUEIROZ, K.C.S.; LEITE, E.L. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. **Infarma**, v.16 , n.1, p.82-87, 2004.
- RODRIGUES, J.A.G. **Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e seu efeito imunoestimulante no camarão marinho *Litopenaeus vannamei***. 2006. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- RODRIGUES, J.A.G.; SOUSA, J. J.; LIMA, P.C.W.C.; LOURENÇO, J.A.; FARIAS, W.R.L. Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Halymenia pseudofloresia* mediante estratégia profilática. **Revista Ciência Agronômica**, v.40, n.1, p.71-78, 2009.
- SAKAI, M. Current research status of fish imunoestimulants. **Aquaculture**, Amsterdam, v.172, n.1, p.63-92, 1999.
- SMITH, V.J.; BROWN, J.H.; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v.15, n.1, p.71-90, 2003.
- SOARES, N.N. **Cultivo da microalga marinha *tetraselmis gracilis* em laboratório. Extração e purificação de polissacarídeos sulfatados**. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- STYER, L. **Bioquímica**. 4º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- TALARICO, L.B.; PUJOL, C.A.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; NOSEDA, M.D DAMONTE, E.B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral research**, Amsterdam, v.66, n. 2-3, p. 103-110, Jun 2005. .

TAYLOR, W.R. **Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas.** The University of Michigan Press, 1960.

TINMAN, S; KELVIN, F; CARVALHO-FILHO, J. Effect of long-term oral administration of peptidoglycan (PG- Ajinomoto product) on growth rate and imunoestimulation response of hybrid tilapia (*O. aureus X O. niloticus*). **International Symposium on Tilápia Aquaculture.** Rio de Janeiro, v.2, p. 524-532, 2000.

TORRES, V. M. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Champia feldmannii*.** Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

WATANUKI, H; OTA, K; MALINA, A.C; TASSAKKA, A.R; TAKO, T; SAKAI, M. Imunnoestimulant effects of dietary *Spirulina platensis* carp *Cyprinus carpio*. **Aquaculture.** 2006.

ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XU, Z. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, London, v. 50, n. 1, p. 47-53, Jul 2004.