



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE GALACTANAS SULFATADAS DE ALGAS  
MARINHAS VERMELHAS DO GÊNERO *Halymenia* E SEU EFEITO  
IMUNOESTIMULANTE NO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*

JOSÉ ARIÉVILO GURGEL RODRIGUES

FORTALEZA-CEARÁ-BRASIL  
NOVEMBRO/2006

ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE GALACTANAS SULFATADAS DE ALGAS  
MARINHAS VERMELHAS DO GÊNERO *Halymenia* E SEU EFEITO  
IMUNOESTIMULANTE NO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*

JOSÉ ARIÉVILO GURGEL RODRIGUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE PESCA

FORTALEZA-CEARÁ-BRASIL  
NOVEMBRO/2006

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

---

José Ariévil Gurgel Rodrigues

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/11/2006

---

Prof. Wladimir Ronald Lobo Farias, D.Sc.  
Orientador da Dissertação  
Presidente

---

Prof. Paulo Antônio de Souza Mourão, Ph.D.  
Conselheiro

---

Prof<sup>a</sup>. Silvana Saker Sampaio, Ph.D  
Conselheiro

Dedico este trabalho a Deus, pelo desfecho de mais uma etapa de minha vida, e para todos aqueles que sempre me deram incentivos em continuar na busca pelas minhas metas profissionais.

## AGRADECIMENTO

Primeiramente a **Deus**, ao qual devo tudo que conquistei a te hoje, pela sua companhia na busca pelas minhas convicções e anseios profissionais, a Engenharia de Pesca. Através de seus ensinamentos, procurarei sempre agir com ética e postura responsável entre as pessoas;

A minha família, **Célia** e **Ari** (meus pais) e **Aracélia** e **Celina** (minhas irmãs), que mesmo ainda sem compreenderem a minha perseverança pelos meus ideais profissionais;

As minhas **tias** e **avô**, que não estão mais entre meu convívio, dedico também este trabalho de dissertação;

Os meus louváveis agradecimentos ao meu mestre, orientador e amigo, Prof. Dr. **Wladimir Ronald Lobo Farias**, pelas horas de dedicação, paciência e ensinamentos profissionais (concedidos a mim) durante todo o meu curso de mestrado, os quais procurarei transmitir em um futuro próximo;

Também aos meus profundos amigos **Silvana** e **Alexandre**. A Prof. **Silvana** presto minha profunda admiração pelo seu carisma, cordialidade e conselhos prestados a minha pessoa. E ao Prof. **Alexandre**, retrato aqui, uma grande consideração também pela sua pessoa e nunca esquecerei o que fizestes por mim durante todo o meu curso de mestrado. Muito obrigado!;

Ao Dr. **Paulo Antônio de Souza Mourão**, Professor da Universidade do Rio de Janeiro, pela sua grande atenção e disponibilidade em aceitar ao meu convite para participar de minha banca de defesa de dissertação de mestrado;

Ao Prof. **Francisco Hiran Farias Costa**, pela disponibilidade do laboratório de Aqüicultura para a realização de pesquisa;

Ao Coordenador do curso de mestrado em Engenharia de Pesca, Prof. Dr. **Manuel Furtado**, pela sua atenção durante todo o meu curso de mestrado. Muito obrigado!;

Não poderia deixar de agradecer também aos estudantes de graduação (UFC) que me ajudaram tornar este trabalho de dissertação real. Presto meus sinceros agradecimentos a **Daniel Barroso de Alencar**, **Jefferson**, **Anderson**, **Anita**, **Lorena Soares Monteiro**, **Felipe**, **Rômulo Malta** e **Rafael**. Em especial ao estudante **Daniel**, do qual foi muito importante na execução deste trabalho;

Aos estudantes de mestrado, **Kelma Pires**, **Glácio Sousa Araújo** e **Valeska Martins Torres**, do curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. Em especial a **Kelma**, a qual nunca se negou a oferecer alguma ajuda neste trabalho. Obrigado!;

As alunas de iniciação científica do laboratório (BIOMOL), **Raphaela Melo** e **Anúsia**, pela compreensão na hora de execução do trabalho;

Os meus agradecimentos aos estudantes de graduação, **Eduardo Izidorio de Melo**, e de pós graduação, **Fábio Rabelo Melo** e **Leonardo Paes Cinelli**, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Laboratório de Tecido Conjuntivo), pela atenção (cedida a mim) durante o início do meu projeto de mestrado;

Ao Engenheiro Agrônomo, **Francisco Élder Calvacante Barros**, pela sua disponibilidade no momento inicial deste trabalho;

A **FUNCAP**, pelo auxílio financeiro no momento inicial do trabalho e em prol do desenvolvimento da ciência e tecnologia no Estado do Ceará;

A **CAPES**, pelo auxílio financeiro no momento inicial do trabalho e em prol do desenvolvimento da ciência e tecnologia no Brasil;

A indústria de ração **FRI-RIBE**, representada pelos Engenheiros de Pesca **Ítalo Régis Castelo Branco** (Coordenador Técnico) e **Jeffersson Couto** (Representante de Vendas), pela doação do insumo do qual foi fundamental durante o período experimental;

A Fazenda **Dú Vale**, localizada no município de Jaguaruana/CE, pela doação dos camarões, e por ter me acolhido muito bem, em um momento extremamente difícil. Presto aqui, os meus sinceros agradecimentos;

Aos funcionários **Antônio, Omar Ribeiro, Omar, Edílson, Zacarias, Leni e Henrique**, o meu muito obrigado!;

A secretária do curso de mestrado em Engenharia de Pesca, **Rogéria**, pela sua atenção e consideração.

*Obrigado a todos!*

## SUMÁRIO

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>DEDICATÓRIA</b>  |               |
| <b>AGRADECIMENTOS</b>   |               |
| <b>RESUMO</b>   | iii           |
| <b>ADSTRACT</b>   | v             |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>   | vi            |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>   | viii          |
| <b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b>   | ix            |
| <br>  |               |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | <b>1</b>      |
| 1.1. Algas marinhas.  | 1             |
| 1.2. O gênero <i>Halymenia</i> .  | 3             |
| 1.3. Polissacarídeos sulfatados (PS) de algas marinhas.                               | 4             |
| 1.4. Atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados.                            | 9             |
| 1.4.1. Atividade anticoagulante.  | 12            |
| 1.4.2. Atividade imunoestimulante.  | 15            |
| 1.5. Produção de camarão marinho, <i>Litopenaeus vannamei</i> , no Brasil e no mundo. | 20            |
| <br>  |               |
| <b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>   | <b>26</b>     |
| 2.1. Coleta e identificação das algas marinhas.                                       | 26            |
| 2.2. Extração dos polissacarídeos sulfatados.   | 27            |
| 2.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em coluna de troca iônica.          | 30            |
| 2.4. Teste de Dubois.   | 30            |
| 2.5. Eletroforese em gel de agarose.  | 31            |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6. Atividade anticoagulante.   | 31        |
| 2.7. Efeito imunoestimulante.  | 32        |
| 2.7.1. Aquisição e manejo dos camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> .   | 32        |
| 2.7.2. Preparação das soluções de polissacarídeos sulfatados.  | 33        |
| 2.7.3. Procedimento experimental.  | 33        |
| 2.7.4. Análises fídico-químicas.   | 34        |
| 2.8. Análises estatísticas.  | 35        |
| 2.9. Extração dos polissacarídeos sulfatados dos camarões.   | 36        |
| 2.10. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em coluna de troca iônica.  | 37        |
| 2.11. Eletroforese em gel de agarose.  | 37        |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | <b>38</b> |
| 3.1. Extração dos polissacarídeos sulfatados.  | 38        |
| 3.2. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em DEAE-celulose.  | 39        |
| 3.3. Eletroforese em gel de agarose.   | 43        |
| 3.4. Atividade anticoagulante (aPTT).  | 46        |
| 3.5. Efeito imunoestimulante.  | 49        |
| 3.5.1. Biomassa viva final.  | 50        |
| 3.5.2. Parâmetros físico-químicos.   | 55        |
| 3.5.3. Extração dos polissacarídeos sulfatados dos camarões.   | 56        |
| 3.5.4. Análise cromatográfica, em coluna de DEAE-celulose, dos extratos brutos de polissacarídeos sulfatados obtidos das algas e dos camarões. | 57        |
| 3.5.5. Eletroforese das frações eluídas a partir do extrato bruto dos camarões.  | 61        |
| <b>4. CONCLUSÃO</b>  | <b>64</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | <b>65</b> |



## RESUMO

Muitos compostos têm sido descritos como anticoagulantes e imunostimulantes, dentre esses os polissacarídeos sulfatados (PS) de algas marinhas que também são conhecidos por apresentar outras atividades biológicas, tais como antitrombótica e antiviral. A descoberta de novas drogas anticoagulantes é importante para prevenir os efeitos adversos do uso da heparina, como hemorragias e trombocitopenia. Além disso, o uso de imunostimulantes também pode reduzir o impacto do estresse no cultivo intensivo de organismos aquáticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de duas espécies de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e o seu efeito imunostimulante no camarão branco *Litopenaeus vannamei*. Os PS foram extraídos, através de digestão enzimática, a partir de algas marinhas coletadas na Praia de Fleixeiros/CE. Em seguida, os extratos brutos foram fracionados em coluna de DEAE-celulose, sendo as frações eluídas com soluções de diferentes concentrações de NaCl e o grau de purificação analisado por eletroforese. A atividade anticoagulante das frações foi avaliada pelo teste do aPTT, utilizando plasma de coelho citratado, sendo o tempo de coagulação registrado em um coagulômetro. Para avaliar efeito imunostimulante, três doses diferentes de PS foram administradas, através de banhos de imersão, no camarão *L. vannamei*. Os tratamentos, com três repetições cada, foram  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ;  $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $1,0 \text{mg.L}^{-1}$ , e um controle, sem polissacarídeos. O experimento teve duração de 20 dias, dos quais 15 dias foram para a aplicação das soluções de

PS e 5 dias de indução de estresse, através da ausência de renovação de água do cultivo. A administração das doses foi realizada, duas vezes por dia (09:00 e 17:00 h), após as trocas de água e antes da alimentação dos animais. Depois de 15 dias de imersão, não houve diferenças significativas entre as taxas de mortalidade dos tratamentos. Entretanto, depois do período do estresse, o tratamento com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  apresentou uma mortalidade significativamente menor do que as observadas nos tratamentos s/PS e  $0,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ . Com relação à atividade anticoagulante, as frações obtidas da espécie *H. pseudofloresia* apresentaram uma maior atividade, sendo a mais ativa aquela eluída com  $1,25 \text{ M de NaCl}$  da coluna de troca iônica, obtida da 1ª extração. Assim, com a realização deste trabalho, foi possível obter PS da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia* com atividade anticoagulante superior à heparina e capaz de reduzir a mortalidade do camarão *L. vannamei* submetidos às condições de estresse.

## ABSTRACT

Many substances have been shown to possess anticoagulant and immunostimulant activities, including sulfated polysaccharides (SP) of marine algae. They also exhibit antithrombotic and antiviral activities. It is important to describe new substances capable of preventing known adverse effects of heparin such as hemorrhages and thrombocytopenia. Moreover, the use of immunostimulants can also lessen cultivated aquatic organism stress. The aim of this work was to evaluate both the anticoagulant activity of sulfated galactans present in two species of red marine seaweed belonging to genus *Halymenia* and their immunostimulant effects on white Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei*. SP were extracted from marine seaweed collected in Praia de Fleixeiras-CE. Following the extraction, crude extracts were fractionated in DEAE-cellulose column and fractions were eluted with different concentrations of NaCl solution. Fraction purification grade was evaluated by electrophoresis. Anticoagulant activity was analyzed by aPTT's test using rabbit plasma and the clotting time was measured in a coagulometer. Three different amount of SP (0.5 and 1.5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  and 1.0  $\text{mg.L}^{-1}$ ) were used twice a day (9 and 17h) to evaluate immunostimulant activity on *L. vannamei* through immersion baths, after changing tank water and before feeding the animals. The control group was maintained without SP addition. The experiment lasted 20 days. Shrimps were treated by immersion in SP for the first 15 days, and in the last 5 days they were submitted to stress when no water was renewed. There was no significant difference on mortality among the treatments. After the stress, the mortality of shrimps treated with 1.0  $\text{mg.L}^{-1}$  was lower than the others (control group, 0.5 and 1.5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Anticoagulant activity was detected in fractions obtained from *H. pseudofloresia*, the highest being in that eluted with 1.25 M NaCl from the first extraction procedure. Thus, it was possible to obtain SP from red marine seaweed *H. pseudofloresia* which showed higher anticoagulant activity than heparin and was capable of lowering mortality of *L. vannamei* under stress conditions.

## LISTA DE FIGURAS

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura de um proteoglicano de mamífero (“agregan”) mostrando a proteína central em azul e as cadeias de condroitim sulfato (CS) e queratam sulfato (KS). Fonte: Glycoword.       | 5             |
| <b>Figura 2.</b> Estruturas químicas de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas: (A) fucoidam; (B) agar; (C) carragenanas.  | 7             |
| <b>Figura 3.</b> Unidades monoméricas do ácido algínico presente em algas marinhas pardas (FAO, 1987).   | 8             |
| <b>Figura 4.</b> Unidade dissacarídica repetitiva da heparina (MIKUS et al., 2004).  | 13            |
| <b>Figura 5.</b> Camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i> .   | 21            |
| <b>Figura 6.</b> Alga marinha vermelha <i>Halymenia pseudofloresia</i> . Em destaque o talo em formato de fita (A) e as regiões dicotômicas em (B).  | 27            |
| <b>Figura 7.</b> Alga marinha vermelha <i>Halymenia</i> sp. Em destaque o talo foleáceo expandido (A) fixo ao apressório (B).  | 27            |
| <b>Figura 8.</b> Fluxograma dos procedimentos de extração para a obtenção dos polissacarídeos sulfatados totais.   | 29            |
| <b>Figura 9.</b> Vista parcial do sistema de aquários utilizado durante o período experimental.  | 34            |
| <b>Figura 10.</b> Rendimento (%) dos extratos brutos das algas marinhas vermelhas <i>Halymenia</i> sp e <i>H. pseudofloresia</i> , em cada uma das extrações.  | 38            |
| <b>Figura 11.</b> Cromatografia em DEAE-celulose dos PS, obtidos na 1 <sup>a</sup> (A), 2 <sup>a</sup> (B) e 3 <sup>a</sup> (C) extrações da alga marinha vermelha <i>Halymenia</i> sp.              | 40, 41        |
| <b>Figura 12.</b> Cromatografia em DEAE-celulose dos PS, obtidos na 1 <sup>a</sup> (A), 2 <sup>a</sup> (B) e 3 <sup>a</sup> (C) extrações da alga marinha vermelha <i>Halymenia pseudofloresia</i> . | 42            |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 13.</b> Eletroforese em gel de agarose 0,5% das frações obtidas na 1 <sup>a</sup> e 3 <sup>a</sup> extrações de PS da espécie <i>Halymenia</i> sp. Extrato bruto (EB) e as frações F1; F2 e F3.                   | 44 |
| <b>Figura 14.</b> Eletroforese em gel de agarose 0,5% das frações obtidas na 1 <sup>a</sup> e 3 <sup>a</sup> extrações de PS da espécie <i>Halymenia pseudofloresia</i> . Extrato bruto (EB) e as frações F1; F2 e F3.      | 45 |
| <b>Figura 15.</b> Mortalidade semanal dos camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> , por tratamento, durante o período experimental.<br>Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas ao nível de 5%.     | 50 |
| <b>Figura 16.</b> Biomassa final viva dos camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> , por tratamento, ao término do período experimental.<br>Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas ao nível de 5%. | 51 |
| <b>Figura 17.</b> Variação da concentração do nitrogênio amoniacal (mg. <sup>-L</sup> ) durante o período de cultivo.   | 56 |
| <b>Figura 18.</b> Cromatografias em coluna de DEAE-celulose dos extratos brutos obtidos dos camarões e da alga marinha <i>Halymenia pseudofloresia</i> .  | 58 |
| <b>Figura 19.</b> Eletroforeses em gel de agarose das frações do extrato animal (F1c; F2c e F3c) e da alga marinha <i>Halymenia pseudofloresia</i> (F1a; F2a e F3a).  | 62 |

## LISTA DE FIGURAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Tabela 1.</b> Atividade anticoagulante (aPTT) das frações de polissacarídeos sulfatados obtidas das algas vermelhas <i>Halymenia</i> sp e <i>H. pseudofloresia</i> em relação à heparina não fracionada. | 47            |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABCC.** Associação Brasileira dos Criadores de Camarão.
- AIDS.** Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.
- aPTT.** Tempo de Ativação Parcial da Tromboplastina.
- CS.** Condroitim Sulfato.
- DMB.** Azul Dimetil Dimetileno.
- DS.** Dermatam Sulfato.
- EB.** Extrato Bruto.
- FAO.** Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura.
- KS.** Queratam Sulfato.
- NHP.** Necrose Hepatopancreática.
- PG.** Proteoglicano.
- PS.** Polissacarídeo Sulfatado.
- TT.** Tempo da Trombina.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Algas marinhas

As algas abrangem um vasto grupo do reino vegetal, as quais são classificadas a partir de suas características fisiológicas e morfológicas, sendo incluídas em uma grande variedade de classes, famílias e gêneros. Esses vegetais exercem papéis importantes no meio ambiente e também servem como fonte de produtos naturais com diversos usos para o homem. BICUDO; BICUDO (1970) reportam que as algas encontram-se organizadas em doze classes, treze divisões e diversos outros grupos menores ainda não totalmente estudados. ROUND (1965) comenta que essas plantas abrangem formas unicelulares sem muita diferenciação, formas coloniais, filamentosas e sifonáceas, bem como, complexos talos parenquimatosos, com tecidos especializados para o desenvolvimento de diversas funções.

Dentre as principais divisões de macroalgas marinhas, podem ser citadas Chlorophyta (verdes), Phaeophyta (pardas ou marrons) e Rhodophyta, essa última representada pelas macroalgas vermelhas. A Chlorophyta está representada por cinco ordens no Brasil, cujas espécies se caracterizam pela presença ou não de filamentos, ocorrência ou não de talo cenocítico, presença de vários pigmentos acessórios (carotenóides) e, por último, tendo o amido como substância de reserva (JOLY, 1965).

Para as algas Phaeophyta, JOLY (1965) descreve a ocorrência de quatro classes, as quais podem sofrer ou não alternância de gerações durante o ciclo de vida. Além disso, são organismos eucarióticos, dotados de grandes



quantidades do pigmento acessório fucoxantina e apresentando na sua parede celular celulose, alginato e fucoídina. Como substâncias de reserva podem ser encontradas a laminarina, o manitol e gorduras.

As algas Rhodophyta possuem pigmentos acessórios denominados de ficobilinas, uma substância de reserva denominada de “amido das florídeas”, células reprodutivas femininas arranjadas em uma estrutura especial denominada de carpogônio e gametas masculinos chamados de espermácios (BOLD; WYNNE, 1978). ABBOTT; HOLLENBERG (1976) destacam também que as algas vermelhas são predominantemente marinhas dotadas de uma estrutura multicelular, filamentosa ou pseudoparenquimatosa, com ou sem ramos, podendo ocorrer talos na forma cilíndrica, comprimida ou foliácea e com diversos exemplares microscópicos. Na divisão Rhodophyta são encontradas duas classes de algas marinhas, a Bangiophyceae e a Florideophyceae. A primeira é caracterizada por uma estrutura reprodutiva não muito definida. Já a segunda classe, apresenta um ciclo de vida mais complexo que envolve plantas gametófitas e esporófitas (GRAHAM; WILCOX, 2000).

NORRIS; KUGRENS (1982) relatam que os exemplares dessa divisão podem ser encontrados nos mares tropicais, subtropicais e temperados, com uma ocorrência mais restrita nas regiões boreais e sub-boreais, distribuindo-se desde a zona de marés (zona intertidal e subtidal) até a profundidade de 200m.

De acordo com dados sobre a ficologia marinha no Brasil, publicados por OLIVEIRA FILHO (1977), são conhecidos aproximadamente 128 gêneros com 327 espécies de algas pertencentes à divisão Rhodophyta.

## 1.2. O gênero *Halymenia*

As algas do gênero *Halymenia* C. Agardh (1817) são descritas como plantas de talo foleáceo, inteiro ou variavelmente lobulado ou ramificado com consistência gelatinosa ou carnosa flexível, mostrando, em sua estrutura medular, filamentos delgados bem separados em uma camada gelatinosa (TAYLOR, 1960). Esse gênero está distribuído nos mares tropicais, sendo registradas até então 161 espécies (ABBOTT; HOLLENBERG, 1976; WOMERSLEY, 1994).

A sistemática desse gênero ainda é muito contraditória na literatura vigente. Diversos estudos taxonômicos são feitos há décadas a fim de definir seu arranjo ideal dentro da Ficologia. Em uma antiga classificação taxonômica, o gênero participava da extinta ordem Cryptonemiales (VAN DEN HOEK; CORTEL-BREEMANN, 1970; DIXON et al., 1972; WISEMAN, 1977). Essa ordem foi dividida em dois grandes grupos de famílias: o primeiro formado pelas famílias Dumontiaceae, Gloiosiphonaceae, Endocladiaceae, Halymeniaceae e Kallymeniaceae e, o segundo, representado pelas famílias Rhodophyllidaceae, Polyideaceae, Peyssonelliaceae, Hildenbrandiaceae, Squamariaceae e Choreocolacaceae, sendo esta última, de classificação ainda muito duvidosa (KYLIN, 1956).

JOLY (1965) ainda inclui as famílias Corallinaceae e Grateloupiaceae na ordem Cryptonemiales, sendo a família Grateloupiaceae representada pelos gêneros *Cryptonemia*, *Grateloupia* e *Halymenia*.

Atualmente, apesar de todo o esforço para encontrar uma melhor classificação para as espécies de algas marinhas vermelhas da ordem

Cryptonemiales, os ficologistas resolveram reunir todos os exemplares da antiga e extinta ordem e incluí-los na ordem Gigartinales, pois os critérios de separação eram ainda muito artificiais (GRAHAM; WILCOX, 2000).

### **1.3. Polissacarídeos sulfatados (PS) de algas marinhas**

Os carboidratos são moléculas orgânicas que têm na sua estrutura química o radical poliidroxialdeído ou poliidroxicetonas e ocorrem amplamente em todos os seres vivos, principalmente nos vegetais. Esses compostos podem ser classificados de acordo com o número de unidades de açúcares, ou seja, monossacarídeos, oligossacarídeos (dissacarídeos, trissacarídeos etc) e polissacarídeos, os quais são constituídos por vários resíduos de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas podendo ainda ser lineares ou ramificados. Dentre os polissacarídeos mais comuns, estão celulose, amido, glicogênio e quitina, esse último encontrado em artrópodes (MENEZES, 1991).

Entretanto, essas moléculas orgânicas podem apresentar sulfato na sua estrutura química, sendo então denominados de polissacarídeos sulfatados (PS). Por definição, os PS são polímeros formados por unidades repetitivas de açúcares e carregados negativamente devido à presença de radicais sulfato. Essas moléculas estão amplamente distribuídas tanto nos reinos animal (vertebrados e invertebrados), como no vegetal, onde são encontrados em grandes quantidades nas algas marinhas, porém, ausentes em plantas superiores (MATHEWS, 1975; CÁSSARO; DIETRICH, 1977; PAINTER, 1983; HUSSEIN et al., 1998). Recentemente, a presença desses polímeros foi detectada em gramíneas marinhas (AQUINO et al., 2005).

Em sua grande maioria, os PS não ocorrem isoladamente. Essas moléculas formam compostos de maior complexidade ligados covalentemente a uma proteína central e denominados de proteoglicanos (PGs) (Figura 1). Nos vertebrados, esses PGs estão representados por açúcares sulfatados chamados de glicosaminoglicanos (GAGs), dos quais os galactosaminoglicanos, condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS), e os glucosaminoglicanos, heparina e ácido hialurônico, são os mais conhecidos (KJELLÉN; LINDAHAL, 1991).

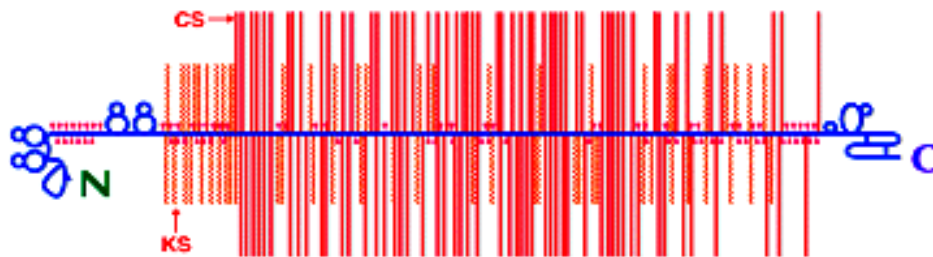


Figura 1. Estrutura de um proteoglicano de mamífero (“agregan”) mostrando a proteína central em azul e as cadeias de condroitim sulfato (CS) e queratam sulfato (KS). Fonte: Glycoword.

Com respeito às algas marinhas, diversos PS já foram isolados e caracterizados. De acordo com PERCIVAL; MCDOWEL (1967), esses açúcares sulfatados estão presentes nas algas marinhas pardas (Phaeophyceae) na forma de fucanas, como galactanas nas algas vermelhas (Rhodophyceae) e, nas algas verdes (Chlorophyceae), os mais comuns são as arabino-galactanas.

Nas algas marinhas, de uma maneira geral, os PS são encontrados na parede celular como dois componentes: fibrilar e amorfo. O primeiro é responsável pela forma da estrutura da parede, enquanto o segundo, dá

origem à matriz celular na qual todo o componente fibrilar encontra-se banhado. Dentre os componentes mucilaginosos mais comuns nas algas pardas estão o ácido algínico e o fucoidam (Figura 2A), galactanas e polímeros de galactose nas algas vermelhas (ágar, carragenana, porfirana, furcellerana e funorana) e resíduos nas algas verdes (D-galactose, D-xilose, D-ácido glucurônico, L-arabinose e L-ramnose) (PAINTER, 1983).

O ágar (Figura 2B) foi o primeiro ficocolóide a ser usado na indústria alimentícia na forma de géis e em diversas outras aplicações industriais, como aditivos em alimentos (SELBY; WYNNE, 1973; MEER, 1980; GLICHSMAN, 1983). É um composto insolúvel em água fria, mas solúvel em água quente, formado de monômeros de galactose. O ágar pode ser extraído de algumas espécies dos gêneros *Gelidium*, *Gelidiella* e *Gracilaria*, e várias outras como *Pterocladia capillacea*, *Ahnpheltia plicata*, *Acanthopheltis japonica*, *Ceramium hypnaeoides* e *C. boydenii*, por exemplo (LEVRING et al., 1969).

Assim como o ágar, a carragenana (Figura 2C) também é muito valorizada comercialmente. Esse polímero, altamente sulfatado, detém propriedades aniônicas e hidrofílicas o que permite os mais diferentes usos, como na fabricação de sorvetes, produtos de leite pasteurizado, chocolates, estabilização de emulsificantes, cremes aerossóis etc (GUISELEY et al., 1980). Dentre as espécies produtoras podem ser citadas *Gigartina stellata* (SMITH, 1905), *G. acicularis*, *G. pistillata*, *G. canaliculata*, *G. chamissoi*, *G. radula*, *G. skottsbergii*, *Chondrus crispus*, *C. ocellatus*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Furcellaria fastigiata*, *Hypnea musciformis* e *H. spicifera* e, ainda, espécies do gênero *Euclima* (EISSES, 1953; ZANEVELD, 1955; 1959).

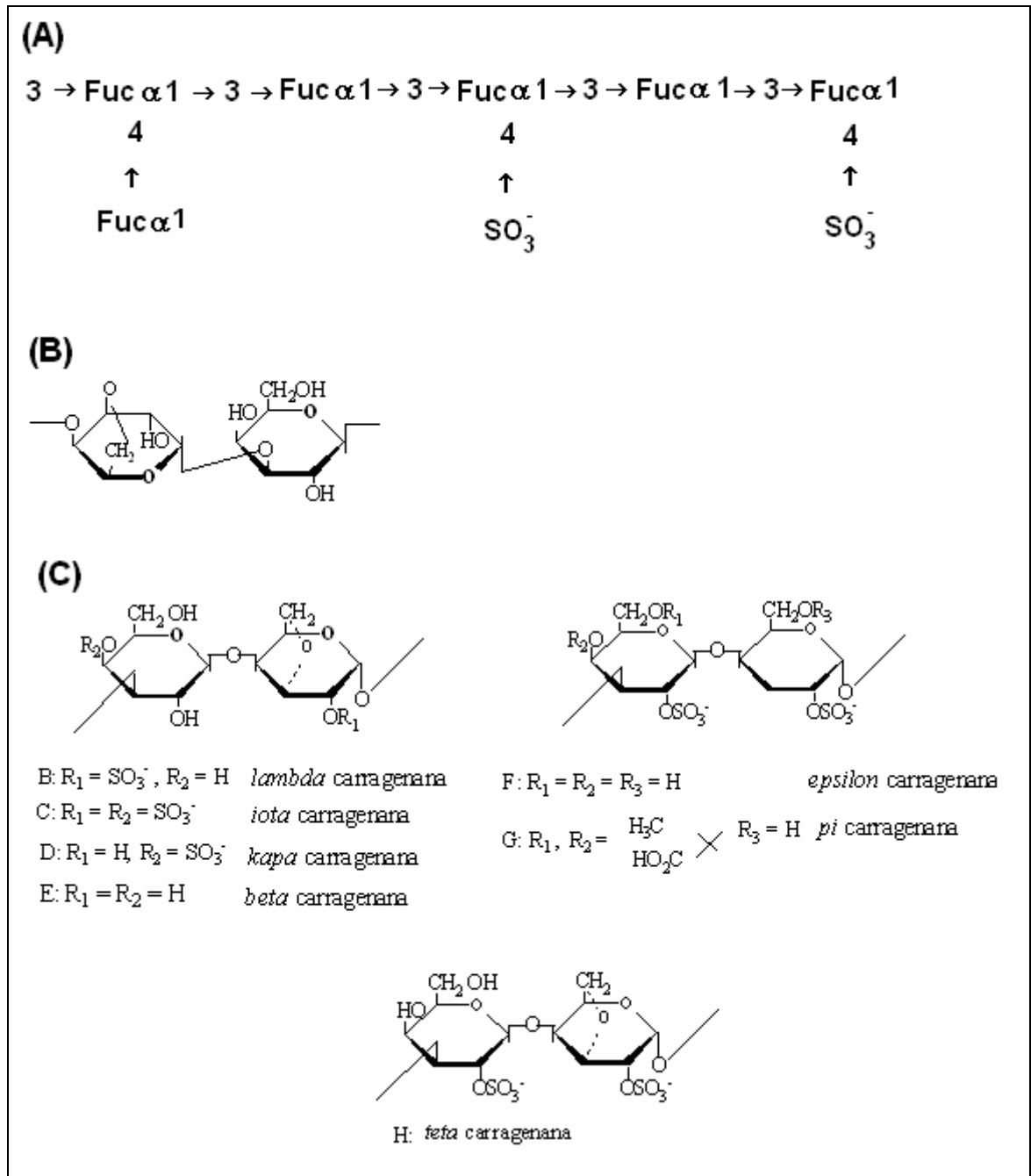


Figura 2. Estruturas químicas de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas: (A) fucoidam; (B) ágar; (C) carragenanas.

Diferentemente do ágar e da carragenana, o alginato, em cuja composição química são encontrados os ácidos manurônico e gulurônico (Figura 3), está restrito somente às algas marinhas pardas. Espécies dos gêneros *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis*,

*Sargassum* e *Turbinaria* são grandes produtoras desse ficocolóide. Os alginatos podem ser usados como produtos farmacêuticos, em alimentos, na fabricação de papéis etc (HILTON,1969; McNEELY; PETTITT, 1973).

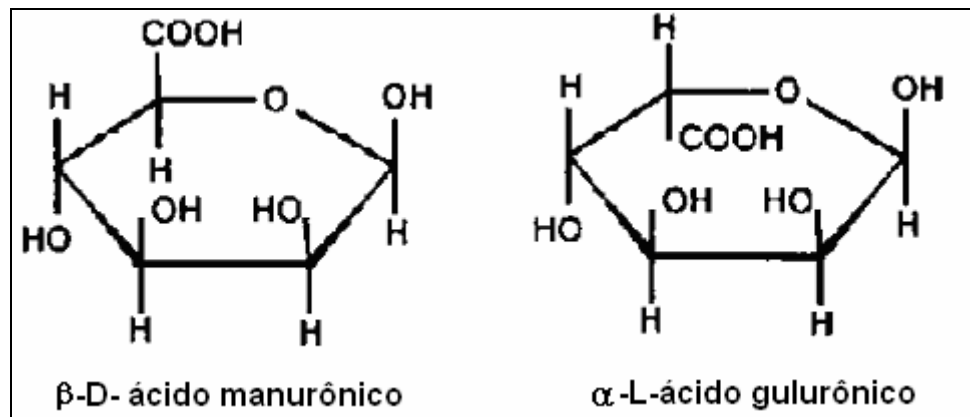


Figura 3. Unidades monoméricas do ácido alginico presente em algas marinhas pardas (FAO, 1987).

A indústria de ficocolóides é um mercado crescente que movimenta anualmente milhões de dólares no mundo. O interesse econômico pelos ficocolóides explica-se pelo fato de eles apresentarem propriedades gelatinizantes e espessantes, o que lhes agrega considerável valor comercial. Algas do gênero *Gracilaria*, por exemplo, amplamente distribuídas ao redor do mundo, têm como principal ficocolóide o ágar (ADB-FAO, 1983) e, por essa razão, são cultivadas em diversos países para atender a crescente demanda por esse ficocolóide (CHIANG et al., 1981; 1984).

A alga marinha vermelha *Chondrus crispus* é bastante comercializada por ser uma importante fonte de carragenanas, que podem ser utilizadas nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentícia. Além disso, a espécie

também pode ser usada para fazer sopas, géis, agentes para doces e alimento para cavalos (LEVRING et al., 1969).

O Chile investe significativamente na otimização da capacidade industrial de produção, processamento e estudos científicos de algas marinhas. Esse trabalho é de extrema importância, já que a produção de algas no país é baseada no extrativismo dos estoques naturais e a *Gracilaria chilensis* é a única espécie de macroalga marinha cultivada para utilização de matéria-prima pelas indústrias chilenas (BUSCHMANN et al., 1995; NORAMBUENA, 1996; BUSCHMANN et al., 2001).

#### **1.4. Atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados**

Os PS são polímeros de grande importância comercial, tanto na indústria alimentícia quanto como fonte de novas drogas, já que alguns apresentam atividades biológicas, tais como antibacteriana (JENEY et al., 1997; CHOTIGEAT et al., 2004), antiviral (HAYASHI et al., 1996; TALARICO et al., 2005), antitumoral (WANG et al., 2004; ZHOU et al., 2004), imunoestimulante (VADSTEIN, 1997; MILES et al., 2001; ZHOU et al., 2004), entre outras.

Diversos açúcares sulfatados de várias espécies de algas marinhas já foram estudados e caracterizados por diferentes pesquisadores. Entretanto, apesar dessas investigações, os principais estudos com PS estão normalmente centralizados nas fucanas e galactanas sulfatadas pelo fato de elas apresentarem atividades anticoagulante e antitrombótica. Apesar desses compostos serem formados de estrutura heterogênea bastante complexa e de difícil de investigação, seus estudos se fazem necessário como passo



essencial para o desenvolvimento de novas drogas (PEREIRA et al., 1999; FARIAS et al., 2000).

ÂNGULO; LOMONTE (2003) mostraram que o fucoidam, extraído da alga marinha parda *Fucus vesiculosus*, apresentou uma eficiente atividade citotóxica e miotóxica contra o veneno das serpentes *Bothrops asper*, *Cerrophidion godmani*, *Atropoides nummifer* e *Bothriechis schlegelii*.

Além das atividades biológicas citadas, várias outras merecem destaque, tais como antiinflamatória, antiproliferativa, antimetastática e antiadesiva. Alguns trabalhos reportam o efeito inibitório do fucoidam, galactanas, ulvanas, arabinanas e mananas contra o vírus do herpes simples tipos I e II (BOISSON-VIDAL et al., 1995; MAZUMDER et al., 2002; TALARICO et al., 2004; ZHOU et al., 2004). PS extraídos das algas *Nothogenia fastigiata* e *Gracilaria corticata* (vermelhas) e *Sargassum horneri* (parda) apresentaram uma potente atividade contra o vírus do herpes simples tipo I, através da inibição do ancoramento do vírus na célula hospedeira (DAMONTE et al., 1994; HOSHINO et al., 1998; MAZUMDER et al., 2002).

As galactanas sulfatadas extraídas das macroalgas vermelhas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata* também apresentaram atividade antiviral contra o vírus do herpes simples tipos I e II. O mecanismo de ação está relacionado com a inibição da adsorção do vírus na célula-alvo. Além disso, essas galactanas foram eficientes em evitar a infecção viral do herpes tipo II a partir do uso tópico na vagina de roedores (TALARICO et al., 2004).

Segundo ZHANG et al. (2003), uma fração obtida do PS extraído da alga marinha vermelha *Porphyra haitanesis* apresentou efeito inibitório contra a

peroxidação lipídica *in vitro* revelando uma relação dose-dependente em ensaios *in vivo* em camundongos.

Os PS extraídos da alga marinha verde *Ulva pertusa* foram utilizados em testes de atividade anti-hiperlipidêmica. Após a degradação, duas frações de baixo peso molecular foram fornecidas na dieta de ratos durante 21 dias. Os resultados indicaram que esses polímeros, com diferentes pesos moleculares, diminuíram os níveis de lipídios desses animais (YU et al., 2003).

Vários outros estudos também reportam sobre a atividade antitrombótica. MARTINICHEN-HERRERO et al. (2005) relatam o grande desenvolvimento em pesquisas desses polímeros que, além da atividade anticoagulante, possuem efeito antitrombótico. Além disso, os cientistas também abordaram um estudo *in vivo* realizado com o polímero isolado do líquen, *Parmotrema mantiqueirense*, através da administração intravenosa em ratos. Os autores concluíram que a dosagem de 0,5 mg/kg de peso corporal representou a dose ótima para inibir a formação de trombos.

Segundo ZHOU et al. (2004), a Rhodophyceae *Chondrus ocellatus* possui galactanas sulfatadas com atividades antitumoral e imunomodulatória. Esses polissacarídeos foram degradados em frações com diferentes pesos moleculares, e todas apresentaram atividade em maior ou menor grau.

HAYASHI et al. (1996) mostraram que o PS da microalga marinha *Spirulina platensis*, o “cálcio spirulam”, apresentou uma elevada atividade antiviral contra os vírus do herpes simples tipo I e da AIDS (HIV-1).

ALVES et al. (1997), trabalhando com ouriço-do-mar das espécies *Echinometra lucunter*, *Arbacia lixula* e *Lytechinus variegatus*, demonstraram que uma fucana sulfatada presente na camada gelatinosa dos óvulos é

indutora da reação acrossômica em espermatozoides da mesma espécie e não de espécies diferentes. A reação acrossômica acontece quando o espermatozoide encontra o envoltório gelatinoso do óvulo, sendo um passo decisivo para a fusão dos gametas (ALBERTS et al., 1989).

#### **1.4.1. Atividade anticoagulante**

O mecanismo de coagulação sanguínea consiste simplesmente na “conversão” do sangue líquido em coágulo. Para que isso ocorra, é necessária a transformação do fibrinogênio solúvel em filamentos insolúveis através de uma complexa interação enzimática (RANG et al., 2001).

A cascata de coagulação sangüínea envolve uma série de reações dependentes da presença de cálcio. Essas reações podem ocorrer em duas vias, a intrínseca, responsável pelo crescimento e manutenção da rede de fibrina, e a extrínseca, dependente de um fator tecidual (DAVIE et al., 1991). A enzima trombina é necessária para a coagulação do sangue, colaborando tanto para formar a rede de fibrina como para ativar outros cofatores importantes (OLSON; BJORK, 1992).

Os componentes chamados de “fatores” estão presentes no sangue na forma de precursores inativos que são ativados por proteólise, promovendo a ativação de uma pequena quantidade de certo fator que catalisa a formação de quantidades maiores do fator seguinte e assim sucessivamente, de modo que a cascata proporciona um mecanismo de amplificação (RANG et al., 2001).

BOURIN; LINDAHL (1993) afirmaram que a coagulação sangüínea pode ser retardada pela adição do proteoglicano trombomodulina, que se liga à trombina alterando suas atividades procoagulantes para anticoagulantes.

Os anticoagulantes são freqüentemente utilizados no tratamento do sangue durante as práticas de diálises e cirurgias como medicamento para evitar a coagulação intravascular, trombozes decorrentes de diversas doenças e testes *in vitro* utilizando sangue (TAMADA, 2004).

A heparina, polímero heterogêneo da família dos glicosaminoglicanos sulfatados (Figura 4), foi descoberta em 1916. Esse polissacarídeo é um potente anticoagulante extraído do pulmão bovino ou do intestino de suínos, sendo os mais utilizados na clínica médica aqueles de baixo peso molecular (RANG et al., 2001). Além da propriedade anticoagulante, ela também é usada como antitrombótico terapêutico. A heparina consiste em uma cadeia linear de açúcar formada por unidades dissacarídicas repetitivas alternadas de  $\alpha$ -D-glucosamina e  $\alpha$ -L-ácido idurônico (MOURÃO, PEREIRA, 1999).

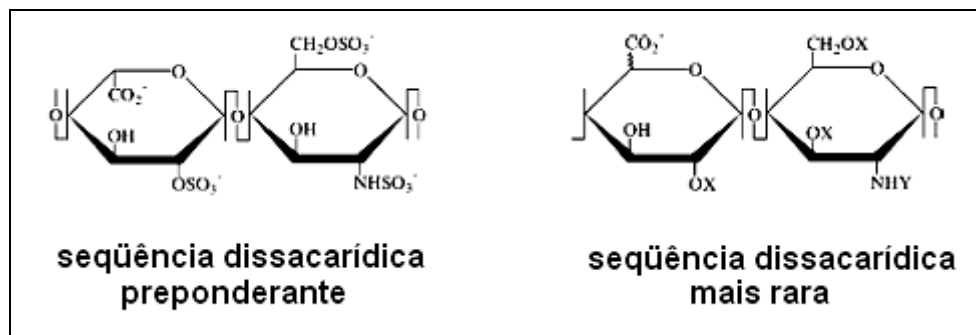


Figura 4. Unidade dissacarídica repetitiva da heparina (MIKUS et al., 2004).

A busca por novas substâncias anticoagulantes e antitrombóticas é justificada, principalmente, pelos efeitos adversos da heparinoterapia como episódios de sangramento e queda na contagem de plaquetas além do risco de contaminação viral, já que é obtida de animais (THOMAS, 1997).

Para muitos cientistas, tais substâncias podem ser encontradas em algas, peixes, crustáceos, pepinos-do-mar, dentre outros organismos marinhos (TARANTINO, 2005).

O primeiro relato de atividade anticoagulante de um PS de alga marinha foi realizado por CHARGAFF et al. (1936). Em seus experimentos, os cientistas associaram a atividade anticoagulante a uma galactana sulfatada obtida da alga vermelha *Iridaea laminarioides*. Mais tarde, de acordo com DI ROSA (1972), essa atividade também foi observada em carragenanas extraídas das algas marinhas vermelhas *Gigartina accicularis* e *Chondrus crispus*.

Nas algas marinhas, diversas frações de polissacarídeos com atividade anticoagulante têm sido isoladas e caracterizadas, especialmente nas classes Rhodophyceae, como nas carragenanas extraídas de *Chondrus crispus*, e Phaeophyceae, nas fucanas sulfatadas presentes em *Laminaria digitata*. Na classe Chlorophyceae, também tem sido reportada em arabino-galactanas nas espécies *Codium fragile* e *C. cylindricum*. Nessa última, o efeito anticoagulante foi similar ao da heparina, embora o mecanismo de ação seja diferente (HAWKINS; LEONARD, 1962; GRAUFFEL et al., 1989; ROGERS et al., 1990; MATSUBARA et al., 2001).

FARIAS et al. (2000), avaliando o efeito de galactanas sulfatadas extraídas da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*, constataram que ela apresenta uma potente atividade anticoagulante, inibindo a ação da trombina via antitrombina e cofator II da heparina.

A atividade anticoagulante de um xilofucoglucuronano sulfatado, obtido por digestão enzimática da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* foi avaliada por LEITE et al. (1998). Segundo os autores, as frações obtidas por

cromatografia em coluna de troca iônica apresentaram uma atividade anticoagulante inferior a da heparina padrão.

HAYAKAWA et al. (2000) relataram a inibição da trombina pelo cofator II da heparina utilizando oito diferentes tipos de PS obtidos de algas marinhas verdes. A atividade anticoagulante desses polímeros foi maior que a obtida com a heparina e com o dermatam sulfato de mamíferos. A inibição mais significativa foi encontrada em um PS isolado de uma espécie da ordem Codiales, sugerindo que esses compostos presentes na divisão Chlorophyta ativam primariamente o cofator II da heparina por um efeito distinto do mecanismo alostérico.

Segundo GHOSH et al. (2004), o extrato bruto obtido da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* não apresentou atividade anticoagulante, verificada através do tempo de ativação da tromboplastina (aPTT) e do tempo da trombina (TT), comparados com aqueles obtidos com a heparina padrão.

Invertebrados marinhos (moluscos, equinodermas e ascídias) também possuem PS com atividade anticoagulante. No caso das ascídias, o polímero é denominado dermatam sulfato. Outro PS, o condroitim sulfato fucosilado, isolado do pepino-do-mar *Ludwigothuria grisea*, também possui atividade anticoagulante e antitrombótica (BURSON et al., 1956; PAVÃO et al., 1998).

#### **1.4.2. Atividade imunoestimulante**

O sistema imunológico é formado por diversas substâncias, células e órgãos específicos responsáveis por desencadear uma reação a um corpo estranho. A imunidade consiste na capacidade de resistência específica

adquirida contra patógenos e seus produtos metabólicos sendo estes denominados de antígenos (KUBITZA; KUBITZA, 1999).

A água é essencial à vida no planeta Terra. Além dessa propriedade vital, a água forma diversos ecossistemas que abriga os organismos marinhos, estuarinos ou de água doce. Entretanto, a água também pode ser um veículo de doenças para transmissão de patógenos e parasitas aos animais aquáticos.

Em sistemas intensivos de cultivo de peixes e camarões, por exemplo, a disseminação de organismos causadores de doenças é favorecida por altas densidades de estocagem, maior aporte de matéria orgânica (restos de ração, fezes e urina) e água de abastecimento. Nos organismos cultivados, esses invasores se instalam por via oral (alimentação), pele, brânquias, narinas e ânus, como também por “transmissão vertical” de mãe para filho.

Dentre os mecanismos de defesa, destacam-se as reações não-específicas e específicas. As reações não-específicas são aquelas inatas do próprio animal ou espécie, adquiridas através da herança genética (muco, proteção mecânica das escamas e da pele, defesa humoral e celular, inflamação e reconstituição de tecidos e reação de emergência sob estresse). As reações específicas estão ligadas à imunidade dos organismos aquáticos, sendo adquiridas ao longo da vida e por exposições aos microrganismos patogênicos e parasitas, tendo como destaque, a imunidade humoral e a imunidade celular. A imunidade humoral consiste na presença de imunoglobulinas e anticorpos, amplamente distribuídos nos animais vertebrados, que reagem especificamente com seu antígeno. Este reconhecimento depende da interação de vários grupos de células: macrófagos (muco e pele), linfócitos T (síntese de imunoglobulinas) e linfócitos B (baço e

mucosa intestinal dos peixes). Já a imunidade celular é responsável pelo combate às infecções bacterianas crônicas, virais e fúngicas. Para isso, ocorre transformação dos linfócitos em células plasmáticas, as quais darão origem a cinco outros tipos de células formadoras de anticorpos (os linfócitos definidos, os plasmócitos, as células blastos, os macrófagos e os eosinófilos). Algumas células irão adquirir uma “memória imunológica” que intensificarão o combate ao antígeno através de ações fagocíticas (KUBITZA; KUBITZA, 1999).

Em crustáceos, as manifestações de defesa estão associadas a hemolinfa, composta pelos hemócitos (“células sanguíneas”) e pelo plasma (HENNIG et al., 1999). A hemolinfa é transportada para vários órgãos, passando pela estrutura branquial, onde ocorrem as trocas gasosas, e retorna ao coração (NEWMAN; BULLIS, 2001). Durante o processo de defesa, o reconhecimento do corpo invasor se faz necessário e, para desempenhar esse papel, os hemócitos e as proteínas plasmáticas são os principais agentes. Desse modo, moduladores protéicos ligam-se aos componentes presentes na parede da célula microbiana, tais como lipopolissacarídeos, peptidoglicanas e  $\beta$ -glicanoproteínas. Uma vez aderidas, essas proteínas se ligam à superfície do hemócito ativando o sistema imune, estimulando a síntese de melanina para a produção de metabólicos tóxicos, resultando então em uma ação antimicrobiana (SRITUNYALUCKSOMA; SODERHALL, 2000). Assim, em crustáceos decápodes, a investigação dos hemócitos sanguíneos tem sido importante nos estudos da ação imunoestimulante (VARGAS-ALBORES, 1995; ROCH, 1999).

No sistema imune inato dos invertebrados destacam-se outros processos, tais como a fagocitose, encapsulação do material invasor,



coagulação sanguínea e aglutinação celular (SODERHLL; CERENIUS, 1992; SRITUNYALUCKSANA; SODERHALL, 2000), dos quais a atividade fagocítica é o mecanismo de defesa mais comum (KONDO et al., 1998).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura estima que em 2020 mais de 50% da produção de pescado deverão provir da aqüicultura, devido ao grande crescimento da população humana, ao crescente aumento da demanda por pescado e ao declínio ou estagnação da produção proveniente da pesca (FAO, 2002). Por outro lado, muitos países que adotam a aqüicultura intensiva têm sofrido com a destruição da vegetação costeira, salinização do solo e poluição dos cursos d'água adjacentes aos cultivos (PHILLIPS et al., 1993).

Além dessa problemática, a aqüicultura intensiva gera situações adversas para os organismos cultiváveis, que podem ser de natureza química, física e/ou biológica. Devido ao grande crescimento da carcinicultura no mundo, surgiram diversas doenças de origem bacteriológica ou viral, limitando a expansão do cultivo de camarão marinho. Várias estratégias visam minimizar este impacto na produção, tais como a redução da densidade de estocagem e o melhoramento no manejo alimentar das pós-larvas. Além disso, essas estratégias atualmente vêm sendo combinadas com o uso de uma grande variedade de imunoestimulantes (VADSTEIN, 1997; HAUTON; SMITH, 2004).

Outras práticas também têm sido utilizadas para combater o aparecimento de doenças, tais como profilaxia sanitária, desinfecção, quimioterapia, uso de antibióticos, probióticos e vacinas contra doenças específicas. Entretanto, algumas práticas apresentam riscos como o uso de

antibióticos que favorece a seleção da microbiota e o acúmulo de resíduos químicos nos organismos dos animais (COOK et al., 2003).

A fim de promover o controle de doenças nos cultivos intensivos de peixes e camarões, muitos cientistas sugerem o uso de imunostimulantes. SAKAI (1999) relata que diversos compostos são utilizados como imunostimulantes, tais como  $\beta$ -glucanos, quitina, lactoferrina e levamisol. Dentre esses compostos, também podem ser citados os fatores nutricionais, tais como as vitaminas B e C, o hormônio do crescimento e a prolactina. Ultimamente, diversas substâncias com efeitos no sistema imune como agentes bacteriológicos, químicos e extratos de plantas e animais têm sido estudadas com o objetivo de controlar doenças.

Vários PS extraídos de algas marinhas já foram descritos como agentes imunostimulantes. Nesse sentido, estudos com o extrato bruto do fucoidam extraído da alga marinha parda *Sargassum polycystum* revelaram que esse polímero pode reduzir o impacto causado pela síndrome do vírus da mancha branca no camarão *Penaeus monodon*. De acordo com a pesquisa, após a inclusão do PS na dieta dos camarões, foi observado um aumento significativo na taxa de sobrevivência. O extrato bruto do fucoidam, administrado por via oral aos camarões, foi capaz de inibir o crescimento do *Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CHOTIGEAT et al., 2004).

A prevenção do estresse em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, foi estudada através da administração de diferentes doses de  $\beta$ -glucano. Os peixes receberam uma suplementação de 0,01; 0,5 e 1,0% do glucano na dieta e, após quatro semanas de alimentação, foram submetidos a um estresse de 2 horas causado pelo transporte, sendo investigadas as mudanças nos níveis de

cortisol, glicose, proteína total e composição da população de leucócitos do sangue. Depois desse período, foram observados níveis elevados de cortisol e glicose no plasma em todos os grupos tratados com  $\beta$ -glucano, indicando que a administração de pequenas doses, antes do transporte, pode ajudar a prevenir os efeitos negativos do estresse (JENEY et al., 1997).

CAMPA-CÓRDOVA et al. (2002) avaliaram os efeitos do  $\beta$ -glucano e de um PS extraído de uma microalga cianofíceia, usados em banhos de imersão de juvenis do camarão, *Litopenaeus vannamei*, por 1, 3 e 6 horas. Os pesquisadores concluíram que esses polímeros apresentaram atividade imunoestimulante, sendo que o PS foi 500 vezes mais potente do que o  $\beta$ -glucano (não sulfatado), após 6 horas de imersão.

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

HUANG et al. (2006) reportaram o uso oral do extrato bruto obtido da alga marinha parda *Sargassum fusiforme*. Os resultados mostraram que, após 30 dias os camarões, *Fenneropenaeus chinensis*, infectados com *Vibrio harveyi*, se tornaram resistentes ao patógeno.

### **1.5. Produção de camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, no Brasil e no mundo**

Dentre as espécies mais utilizadas em aquicultura, destacam-se os camarões das famílias Penaeidae e Palaemonidae. A razão desta demanda

pode ser explicada pelo fato de eles possuírem alto valor nutritivo, admirável sabor e excelentes produções em cativeiro, levando a uma boa cotação no mercado consumidor e respeito perante as comunidades científica e produtora (MENDES, 1992).

O camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Figura 5), tem uma distribuição geográfica que se estende da costa do Panamá até Tumbes, norte do Peru (PEREZ FARFANTE; KENSLEY, 1997). Atualmente essa espécie é cultivada em todos os países do mundo ocidental. Altas produtividades, taxa de crescimento uniforme, fácil adaptabilidade, porte razoável, reprodução satisfatória em laboratório e condições climáticas favoráveis levaram o Brasil a cultivar esse crustáceo (PLATAFORMA TECNOLÓGICA DO CAMARÃO MARINHO CULTIVADO, 2001).



Figura 5. Camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

A aquicultura é uma atividade bastante antiga que possui entre 4.000 a 5.000 anos de história. Apesar disso, a maior expansão ocorreu nos últimos 30 anos, quando a Ásia e a América do Sul avançaram significativamente nesta atividade, que chegou a ser comparada com a avicultura e suinocultura, tendo a China crescido cerca de 260% em apenas 9 anos (NEW, 1999).

Nos últimos 15 anos, a atividade de cultivo de camarão tem se intensificado, principalmente, na costa tropical e subtropical ao redor do mundo. Como consequência dessa expansão, a produção mundial de *L. vannamei* cultivado em 2003 chegou a 1.630.000 t, com os países orientais respondendo por 83,4% do volume produzido, e, os ocidentais, por apenas 16,6%.

O Brasil contribuiu com aproximadamente 90.190 t em 2003, sendo referência de produção no Hemisfério Sul e ocupando o sexto lugar no “ranking” mundial, com o Rio Grande do Norte e Ceará, respondendo por 96,5% do volume total (ROCHA; RODRIGUES, 2004). O censo realizado pela Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC) sobre o perfil da carcinicultura brasileira, no final de 2002 e início de 2003, demonstrou um ritmo acelerado de crescimento, com aumento de 34% no número de produtores e 29% da área de viveiros em produção. O aumento da produção nacional chegou em torno de 50% com produtividade média de 5.458 kg/ha/ano destacando-se, mais uma vez, os estados do Rio Grande do Norte e Ceará, com 30,77 e 27,25% da produção total do camarão marinho *L. vannamei*, respectivamente (ROCHA; RODRIGUES, 2003).

Em 2004, quatro estados brasileiros (RN, CE, BA e PE) se destacaram na produção dessa espécie, gerando muito otimismo no setor para os próximos anos. O Rio Grande do Norte obteve a maior produção do país (30.807 t), enquanto o Ceará se destacou com a maior produtividade (5.101 t/ha/ano) (ABCC, 2006). Entretanto, a partir de 2004, o Brasil enfrentou diversos problemas, com acentuado declínio na produção. Dentre as principais dificuldades podem ser destacadas o surgimento de viroses e a ação

“antidumping” promovida pelos Estados Unidos, o que fez cair bastante seu preço no mercado internacional.

Para os produtores do Rio Grande do Norte, o setor enfrenta a pior crise desde 1992. Em 2005, as exportações tiveram redução de 17% no Estado, somando-se apenas US\$ 57,3 milhões, bem diferente do cenário de 2004, ano em que o setor comercializou cerca de US\$ 82,6 milhões no mercado internacional (MERCADO DA PESCA, 2006).

Recentemente, a União Européia estabeleceu uma outra barreira ao pescado brasileiro. Por meio de medidas sanitárias, os veterinários europeus decidiram exigir testes mais rigorosos aos produtos nacionais diante das condições inadequadas das exportações das carnes brasileiras (MERCADO DA PESCA, 2006).

Dentre as doenças viróticas que agredem a saúde do camarão destacam-se a necrose hepatopancreática (NHP), a mionecrose infecciosa (NIM) e a mancha branca (WSSV).

A NHP surgiu em 1985 nas fazendas de carcinicultura do Estado do Texas (Estados Unidos), chegando a mortalidades da ordem de 90% nos cultivos. Consiste em uma enfermidade causada por uma bactéria Gram-negativa que agride o trato digestivo dos camarões. Acredita-se que a doença é manifestada pelas variações de temperatura, salinidade e pelos impactos ambientais, através de fenômenos de eutrofização, os quais tornam os animais mais vulneráveis aos microrganismos (BUCHELI et al., 2004; NUNES et al., 2004). Inicialmente, o quadro clínico é assintomático, seguido de perda de apetite, diminuição do crescimento, trato digestivo vazio e estrutura branquial

totalmente esbranquiçada e reduzida com túbulos lesionados (NUNES; MARTINS, 2002).

A NIM, até então desconhecida, surgiu nas carcinoculturas do Nordeste brasileiro atingindo a indústria de camarão com prejuízos de aproximadamente US\$ 20 milhões em 2003 (BUCHELI et al., 2004; NUNES et al., 2004). As evidências até agora apontam para o desequilíbrio ambiental, provocado pelas alterações do meio aquático e da modificação da flora e fauna planctônicas, resultando em alterações físico-químicas ocasionadas pelas precipitações pluviométricas ocorridas em curto espaço de tempo no ano de 2004 (FONSECA; CARVALHO, 2004).

Os primeiros registros de incidência do WSSV datam dos anos 90, nos países do Nordeste asiático. A partir de então, a virose rapidamente se espalhou em diferentes países da América Central (Nicarágua, Honduras e Panamá). O diagnóstico da doença envolve alterações macroscópicas, através da observação de manchas esbranquiçadas sob o exoesqueleto, sendo bem mais facilmente reconhecíveis no camarão negro *Penaeus monodon*. No camarão *L. vannamei*, manchas brancas cuticulares podem ou não ser vistas facilmente ao olho nu. Segundo os produtores, a idade para o aparecimento do vírus se dá entre PL20 – PL21, apresentando como sintomas: camarões letárgicos, corpo com coloração rosada ou pardo-avermelhado, mortalidade de até 100% nos primeiros 3 a 10 dias após a exibição dos sinais clínicos, acúmulo de camarões no fundo do viveiro e manchas brancas variando de 0,5 a 2,0 mm de diâmetro no interior do exoesqueleto (NUNES; MARTINS, 2002).

A confirmação da chegada do vírus da mancha branca no Brasil foi publicada em janeiro de 2005 pelo Ministério da Agricultura. O primeiro registro

foi em Santa Catarina, o que causou muita preocupação por parte do setor produtivo daquele estado (JURGENFELD, 2005).

No Ceará, técnicos do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará diagnosticaram a presença do DNA do vírus causador da WSSV em junho de 2005. O primeiro município cearense que revelou a presença da virose foi Aracati na região do Vale do Jaguaribe (O POVO, 2005).

Tendo em vista que o surgimento dessas doenças causou um grande impacto nas produções de camarão tanto em nível mundial como nacional, estratégias que visem tornar esse animal mais resistente às enfermidades são extremamente importantes. Desta forma, a imunoestimulação aliada a um bom manejo ambiental podem contribuir de maneira significativa para a reestruturação do setor.

O objetivo presente trabalho foi avaliar a atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas extraídas das algas marinhas vermelhas *Halymenia* sp e *Halymenia pseudofloresia* C. Agardh, 1817 (Gigartinales), bem como, avaliar o efeito imunoestimulante desses polissacarídeos no camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Coleta e identificação das algas marinhas

A coleta das espécies, *Halymenia pseudofloresia* e *Halymenia* sp. (Gigartinales, Rhodophyta), foi realizada na Praia de Fleixeiras, no município de Trairí/CE, em julho de 2005, a partir de exemplares arribados na zona entre-marés. Logo após a coleta, as algas foram acondicionadas em sacos plásticos e conduzidas ao laboratório de Bioquímica Marinha, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.

A espécie *Halymenia pseudofloresia* (Figura 6) pode ser encontrada nas Ilhas do Atlântico (TAYLOR, 1960), na América do Sul (GANESAN, 1990) e nas Ilhas Caribenhas (LITTLER; LITTLER, 2000). A alga apresenta talo cheio de lóbulos contendo membranas gelatinosas, de formato geralmente irregular, podendo atingir de 7 a 36 cm de comprimento. Na estrutura interna há presença de filamentos dispersos na camada medular (TAYLOR, 1960). Macroscopicamente, seu talo se caracteriza por apresentar um formato de fita de largura variável, com ramificação dicotômica na grande maioria de seus ramos e de textura bastante lisa, fixo no substrato por um apressório basal.

A espécie *Halymenia* sp (Figura 7), também apresenta uma textura bastante lisa em toda sua morfologia externa. Entretanto, a presença de um talo foleáceo expandido e a ausência de ramificações, levaram a diferenciá-la, macroscopicamente, da espécie *Halymenia pseudofloresia*.

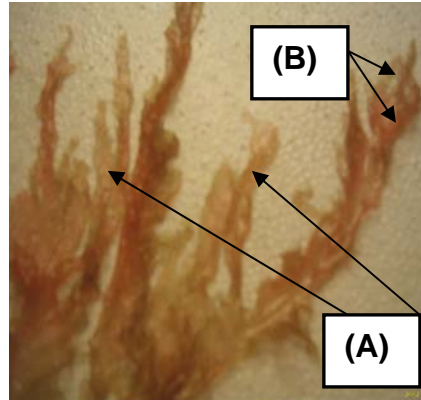


Figura 6. Alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. Em destaque o talo em formato de fita (A) e as regiões dicotômicas (B).

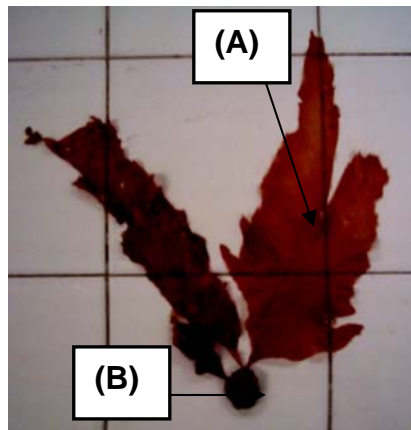


Figura 7. Alga marinha vermelha *Halymenia* sp. Em destaque o talo foleáceo expandido (A) fixo ao apressório (B).

## 2.2. Extração dos polissacarídeos sulfatados

Inicialmente, 5 g de alga seca e triturada foram hidratados com 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5mM.

Em seguida, foram adicionados 17 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg/mL), sendo a mistura incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após esse período, o material foi filtrado, centrifugado (7.965 x g; 25 min; 4°C)

e, ao sobrenadante, foram adicionados 16 mL de cloreto de cetilpiridínio (CPC) a 10% para a precipitação dos polissacarídeos presentes na mistura por, no mínimo, 24 horas à temperatura ambiente.

Logo após a precipitação, os PS foram lavados com 500 mL de CPC 0,05% sendo, em seguida, dissolvidos em 174 mL de cloreto de sódio 2 M : etanol absoluto (100:15;v/v) em banho-maria a 60°C e submetidos a uma nova precipitação por, no mínimo, 24 horas a 4°C, através da adição de mais 305 mL de etanol absoluto.

Em seguida, o material foi novamente centrifugado e submetido a duas lavagens com 500 mL de etanol a 80% e uma com 300 mL de etanol absoluto. Após essa etapa, os PS foram levados à estufa a 60°C, por um período aproximado de 24 horas para secagem e obtenção do extrato bruto (Figura 8). A fim de otimizar o rendimento do extrato bruto, os resíduos foram submetidos a novas extrações.

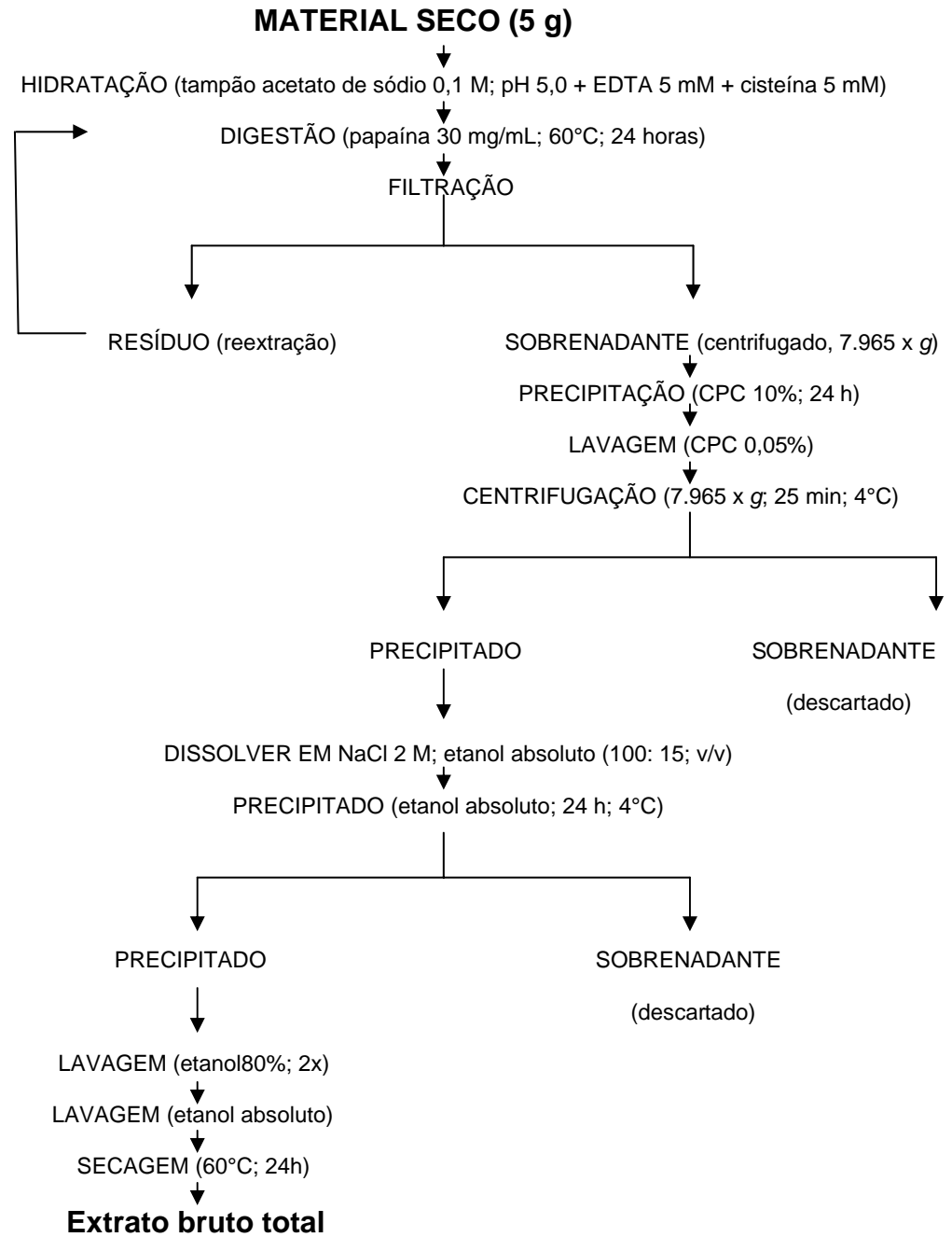


Figura 8. Fluxograma dos procedimentos de extração para a obtenção dos polissacarídeos sulfatados totais.

### **2.3. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em coluna de troca iônica**

Os extratos brutos (EB) obtidos nas várias extrações foram fracionados em coluna de DEAE-celulose (6,5 cm x 1,5 cm) acoplada a um coletor de frações, a fim de separar os PS. A coluna foi, inicialmente, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5mM. Em seguida, foi aplicado no topo do gel 1,0 mL de uma solução de 4 mg/mL de EB sendo o fluxo da coluna ajustado para 60 mL/h. A eluição dos PS presentes no EB foi realizada passo a passo, utilizando soluções com diferentes concentrações de NaCl (0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50; 1,75 e 2,0 M), preparadas no mesmo tampão de equilíbrio. Durante a eluição da coluna, foram coletadas frações de 1 mL e a presença dos PS foi evidenciada através da reação metacromática. Para isso, 200  $\mu$ L de cada fração foram misturados com 1 mL de azul-dimetil-dimetileno (DMB) para a leitura da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 525 nm.

### **2.4. Teste de Dubois**

A presença de açúcar nas frações obtidas da coluna de troca-iônica foi detectada de acordo com a metodologia proposta por DUBOIS et al. (1956). O teste foi realizado em duplicata utilizando amostras de 50  $\mu$ L de solução do polissacarídeo, as quais foram incubadas por 30 minutos com 350  $\mu$ L de água destilada, 20  $\mu$ L de fenol redestilado e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Após 30 minutos de incubação, as amostras foram levadas ao espectrofotômetro para a leitura da absorbância em 490 nm.

## **2.5. Eletroforese em gel de agarose**

As frações contendo os PS foram reunidas, dialisadas exaustivamente contra água destilada e concentradas por liofilização. Em seguida, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão propilenodiamino (0,05 M; pH 9,0). Cerca de 10  $\mu$ L de cada fração (1mg/mL) foram aplicados no gel e a corrida foi realizada em voltagem constante (110V) durante 60 minutos. Após a corrida, os PS presentes no gel foram fixados com uma solução de cetavlon 0,1% por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1%, preparado a partir de 100 mL da solução descorante por 24 horas, e, finalmente, descorado com uma solução de etanol absoluto, água destilada e ácido acético glacial (49,5:49,5:1, v/v/v).

## **2.6. Atividade anticoagulante**

A avaliação da atividade anticoagulante foi realizada pelo teste do aPTT (tempo de ativação parcial da tromboplastina) segundo ANDERSSON et al. (1976), utilizando plasma citratado de coelho; o tempo de coagulação foi determinado em um coagulômetro (Drake, modelo Quick-timer).

Primeiramente, o sangue de coelho foi centrifugado (73,75 x g; 15 min) para a obtenção de um plasma pobre em plaquetas. Para a realização do teste, foram incubados a 37°C por 3 minutos, 50  $\mu$ L de plasma de coelho, 50  $\mu$ L de

cefalina ativada e 5  $\mu$ L de solução de PS. Após a incubação, foram adicionados 50  $\mu$ L de cloreto de cálcio 0,025 M à mistura para ativar a cascata de coagulação. Os testes foram realizados em duplicata, sendo o tempo de coagulação determinado automaticamente pelo coagulômetro. A atividade anticoagulante foi expressa em unidades internacionais por mg (UI/mg) utilizando um padrão de heparina (100 UI/mg).

## **2.7. Efeito imunoestimulante**

O efeito imunoestimulante dos PS obtidos da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia* foi avaliado *in vivo*, utilizando camarões da espécie *L. vannamei* (Boone, 1931).

### **2.7.1. Aquisição e manejo dos camarões *Litopenaeus vannamei***

Aproximadamente 500 exemplares adultos do camarão marinho, *L. vannamei*, aclimatados em água doce e com peso médio de 8,187 g, foram doados pela Fazenda Dú Vale, localizada no município de Jaguaruana/CE, distante aproximadamente 140 km de Fortaleza.

Na fazenda, os camarões foram coletados, estocados em sacos plásticos (40 indivíduos/saco) contendo oxigênio dissolvido e acondicionados em caixas de papelão forradas com isopor. Posteriormente, os camarões foram transportados, durante 3 horas, até o Laboratório de Aqüicultura do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.

No laboratório, os camarões foram aclimatados por 30 minutos em uma caixa d'água de 500 L e, em seguida, estocados aleatoriamente em aquários

contendo 38 L de água doce, na densidade de 0,3 camarões/L. Após a estocagem, os animais permaneceram sob observação durante uma semana para que se recuperassem do estresse causado pelo transporte. Durante esse período, foram realizadas, diariamente (8 e 16 h), duas trocas parciais de 25% da água de cada aquário por sifonamento, sendo também retirados restos de ração e dejetos dos animais. Além disso, foram também realizados ajustes no sistema de aeração e a alimentação foi fornecida, *ad libitum*, em duas refeições diárias, utilizando ração com 35% de proteína bruta. Esse mesmo manejo foi mantido durante o período experimental.

### **2.7.2. Preparação das soluções de polissacarídeos sulfatados**

Os PS totais, obtidos a partir do extrato bruto da espécie *H. pseudofloresia*, foram utilizados em testes de imersão. Para isso, foram preparadas três diferentes doses a fim de se obter concentrações finais de 0,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , 1,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 1,0  $\text{mg.L}^{-1}$  na água de cultivo dos camarões. Inicialmente, os PS foram dissolvidos em um pequeno volume de água destilada e, em seguida, as referidas soluções foram adicionadas, diariamente, nos respectivos tratamentos.

### **2.7.3. Procedimento experimental**

O experimento constou de quatro tratamentos com três repetições cada, sendo o controle sem a adição do PS, e mais três tratamentos contendo PS nas concentrações 0,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , 1,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 1,0  $\text{mg.L}^{-1}$ . As diferentes doses foram administradas através de duas aplicações diárias, uma às 9 h e outra às 17 h, sempre após as trocas de água. Em seguida, os camarões eram



alimentados e a aeração desligada por 1 hora. O experimento teve duração de 20 dias, sendo 15 dias de administração dos PS e 5 dias de indução de estresse, quando trocas parciais de água foram suspensas (Figura 9).



Figura 9. Vista parcial do sistema de aquários utilizado durante o período experimental.

Ao final do experimento, os animais foram contados, pesados e sacrificados, sendo então congelados em freezer. A pesagem foi realizada utilizando uma balança semi-analítica com precisão de 0,01g, (GEHAKA, modelo BG 400).

#### **2.7.4. Análises físico-químicas**

Os parâmetros físico-químicos (pH, temperatura, oxigênio dissolvido e amônia) foram monitorados semanalmente. Todavia, durante os cinco dias de estresse, a frequência do monitoramento foi intensificada, sendo então realizada no primeiro e último dia do período. A avaliação desses parâmetros foi realizada de acordo com as metodologias descritas a seguir.

O pH foi determinado com o auxílio de um medidor de pH de bancada (Marconi, MAPA 200) com precisão de  $\pm 0,005$  pH em duas amostras de água coletadas, semanalmente, de cada tratamento.

A temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e a concentração de oxigênio dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) da água foram determinadas com o auxílio de um oxímetro digital de sonda polarográfica estável, modelo YSI F-1550A, com precisão de  $\pm 0,3^{\circ}\text{C}$  para a temperatura e  $\pm 2\%$  de ar saturado ou 2% de leitura.

A amônia foi determinada através do método de Nessler, a partir de duas amostras de água de cada tratamento, coletadas semanalmente. Esse método está baseado no fato de que, o nitrogênio amoniacal solúvel contido na amostra, na presença do reagente de Nessler forma uma coloração amarela que será tão intensa quanto maior for a presença de amônia. Assim, amostras de 25 mL receberam 3 gotas de um estabilizante mineral, 3 gotas de álcool polivinil e 1 mL do reagente de Nessler. Em seguida, a mistura foi agitada e deixada em repouso por 1 minuto, até que uma coloração amarelada se formasse, indicando a presença do nitrogênio amoniacal na amostra. Um branco foi preparado utilizando os mesmos reagentes em 25 mL de água destilada. Após o repouso, a amostra foi levada a um espectrofotômetro (Hach Company, modelo DR/2000) para a leitura da absorbância em um comprimento de onda de 425 nm, sendo a concentração de amônia expressa em  $\text{mg.L}^{-1}$ .

## **2.8. Análises estatísticas**

Os dados de mortalidade, biomassa final viva e concentração de amônia, obtidos neste experimento, foram submetidos à análise de variância

(ANOVA) com fator único e teste *t* não-pareado para médias. Para todos os testes, foi adotado um nível de significância de 5%.

## **2.9. Extração dos polissacarídeos sulfatados dos camarões**

A extração de PS foi realizada em dois diferentes grupos de camarões, um que não foi exposto aos PS (controle) e outro que recebeu a maior dose de PS (1 mg.L<sup>-1</sup>). Para isso, três indivíduos de cada grupo foram descabeçados e descascados, sendo separada apenas a parte muscular. Em seguida, o músculo foi lavado com uma pequena quantidade de água destilada e levado para secagem em estufa a 40°C durante 24 horas.

A extração foi realizada a partir do material seco (1,2 g), o qual foi cortado e depois hidratado com 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 + cisteína 5 mM e EDTA 5mM. Em seguida, foram adicionados 10% de papaína bruta, sendo a mistura incubada em banho-maria a 60°C por 24 horas. Após esse período, o material foi filtrado em tela fina, centrifugado (7.965 x *g*; 30 min; 4°C) e, ao sobrenadante, foram adicionados 4 mL de cloreto de cetilpiridínio (CPC) a 10% para a precipitação dos PS presentes na mistura por 72 horas à temperatura ambiente.

Logo após a precipitação, os PS foram lavados com 120 mL de CPC 0,05% sendo, em seguida, dissolvidos em 42 mL de cloreto de sódio 2 M:etanol absoluto (100:15, v/v) em banho-maria a 60°C e submetidos a uma nova precipitação por, no mínimo, 24 horas a 4°C através da adição de mais 75 mL de etanol absoluto.

Em seguida, o material foi centrifugado (7.965 x g; 30 min; 4°C) e submetido a duas lavagens com 120 mL de etanol a 80% e uma com 75 mL de etanol absoluto. Após essa etapa, os PS foram então levados à estufa a 60°C, por um período de 48 horas para secagem e obtenção do extrato bruto.

#### **2.10. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em coluna de troca iônica**

Os PS presentes no extrato bruto, obtidos dos camarões, foram fracionados em uma coluna de troca iônica DEAE-celulose de acordo com a metodologia já descrita no item 2.3 (Página 30).

#### **2.11. Eletroforese em gel de agarose**

As frações obtidas na cromatografia de DEAE-celulose foram reunidas, dialisadas exaustivamente contra água destilada, concentradas por liofilização e submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 0,5%, de acordo com o procedimento já descrito no item 2.5. (Página 31).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Extração dos polissacarídeos sulfatados

No total, foram realizadas três extrações de cada espécie de alga e os resultados mostraram que os rendimentos dos extratos brutos foram significativos e semelhantes, sendo de 53,96% para a espécie *Halymenia* sp e de 47,14% para a espécie *H. pseudofloresia*, considerando todas as extrações. Além disso, a maior quantidade de PS foi obtida durante as primeiras extrações das duas algas, sendo decrescente nas demais (Figura 10).

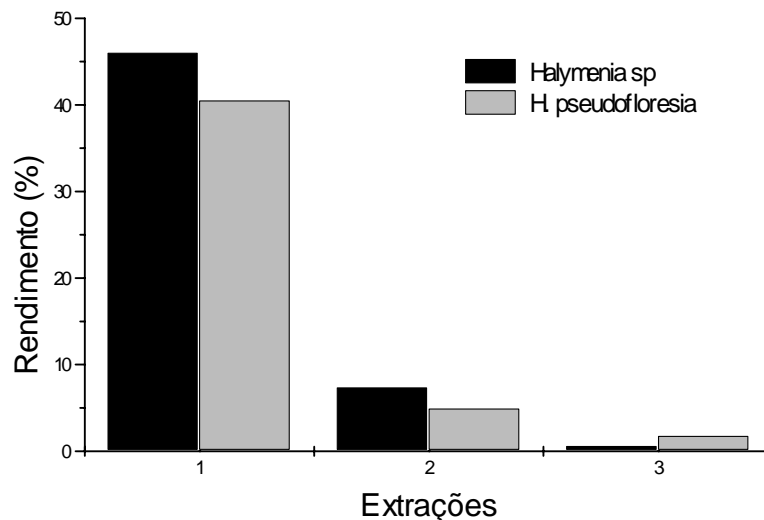


Figura 10. Rendimento (%) dos extratos brutos das algas marinhas vermelhas *Halymenia* sp e *H. pseudofloresia*, em cada uma das três extrações.

Em trabalhos envolvendo a extração de PS de algas marinhas, os extratos brutos obtidos da alga vermelha *Gracilaria cornea* (MELO et al., 2002) e da alga parda *Sargassum polycystum* (CHOTIGEAT et al., 2004) apresentaram rendimentos de 21,4% e 22,3%, respectivamente. Os extratos

obtidos das algas vermelhas *Solieria filiformis* (PONTES, 2005) e *Champia feldimannii* (TORRES, 2005) resultaram, respectivamente, em rendimentos de 46,8% e 36,2%. Já em algas da divisão Chlorophyta, as espécies *Caulerpa racemosa* (RODRIGUES, FARIAS, 2005) e *C. sertularioides* (BEZERRA-NETO, 2005) perfizeram 13,0 e 7,1%, respectivamente. Como é possível observar, existe uma grande variação nos rendimentos de PS extraídos de algas marinhas devido, tanto ao emprego de diferentes metodologias de extração como a utilização de diferentes espécies (CHOTIGEAT et al., 2004).

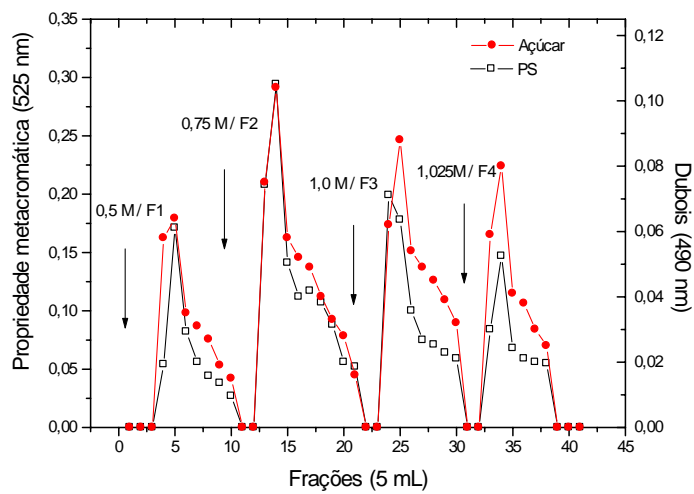
Segundo PONTES (2005), o maior rendimento de PS da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* foi obtido na 1<sup>a</sup> extração, sendo decrescente nas demais, semelhante ao encontrado para as algas *Halymenia* sp e *H. pseudofloresia*, utilizadas neste trabalho. Por outro lado, o aumento ou diminuição do rendimento no decorrer das extrações depende da espécie de alga utilizada. TORRES (2005) afirma que os rendimentos obtidos da alga vermelha *C. feldimannii* aumentaram a partir da 1<sup>a</sup> extração. Este comportamento também foi observado por PEREIRA (2006) e ALENCAR (2006) após estudos com duas espécies da divisão Phaeophyta, sendo uma do gênero *Sargassum* e outra do gênero *Lobophora*.

### **3.2. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados em DEAE-celulose**

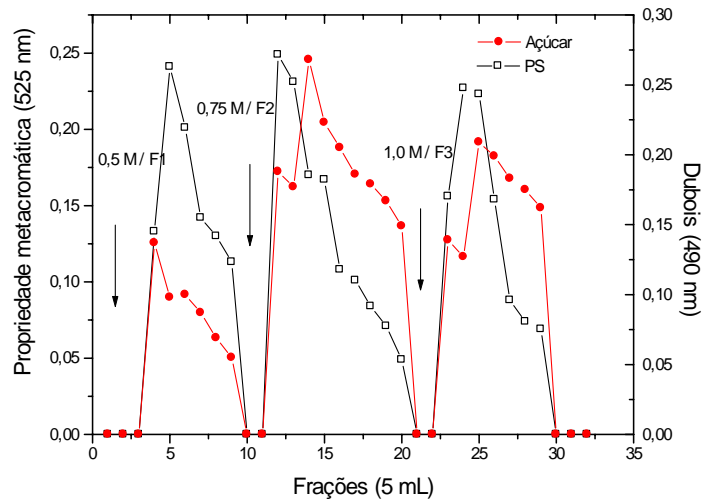
A Figura 11 mostra os perfis cromatográficos dos extratos brutos obtidos a partir das três extrações de PS da alga marinha vermelha *Halymenia* sp. Como é possível observar, na 1<sup>a</sup> extração foram eluídas quatro frações com 0,5 (F1); 0,75 (F2); 1,0 (F3) e 1,25 M (F4) de NaCl, enquanto que nas 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup>

extrações só foram obtidas três frações (F1, F2 e F3), não sendo eluída nenhuma fração com 1,25 M de NaCl (F4). Entretanto, as frações F1 (2<sup>a</sup> extração) e F1 e F2 (3<sup>a</sup> extração) foram as que apresentaram as maiores metacromasias dentre todas as extrações. Além disso, a metacromasia das frações aumentou no decorrer das extrações.

**(A)**



**(B)**



(C)

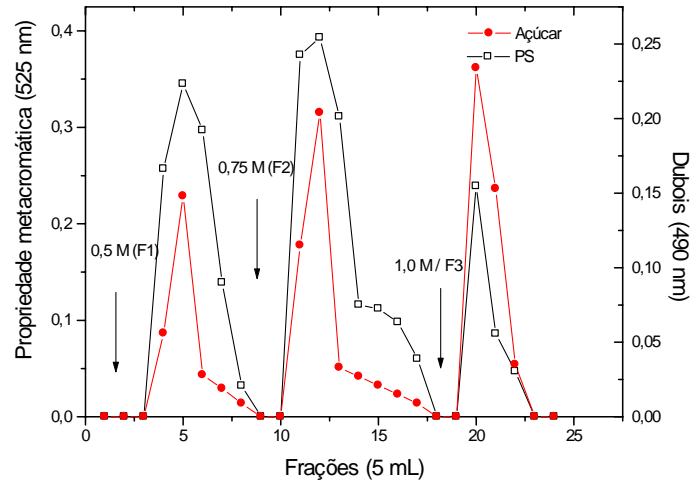


Figura 11. Cromatografia em DEAE-celulose dos polissacarídeos sulfatados, obtidos na 1<sup>a</sup> (A), 2<sup>a</sup> (B) e 3<sup>a</sup> (C) extrações da alga marinha vermelha *Halymenia* sp.

Com relação à espécie *H. pseudofroresia*, na 1<sup>a</sup> extração foram obtidas cinco frações eluídas com 0,5 (F1); 0,75 (F2); 1,0 (F3); 1,25 (F4) e 1,50 M (F5) de NaCl, das quais a fração eluída com 0,5 M (F1) foi a que apresentou a maior metacromasia (Figura 12). Na 2<sup>a</sup> extração foram obtidas apenas as frações F1, F2, F3 e F4 e, na 3<sup>a</sup> extração, apenas as frações F1, F2 e F3. Além disso, nessas últimas extrações, a fração eluída com 0,75 M de NaCl (F2) foi a mais metacromática, sendo a maior diferença observada na 2<sup>ª</sup> extração. Mais uma vez, foi observado um aumento significativo na atividade metacromática das frações (F1, F2 e F3) no decorrer das extrações.



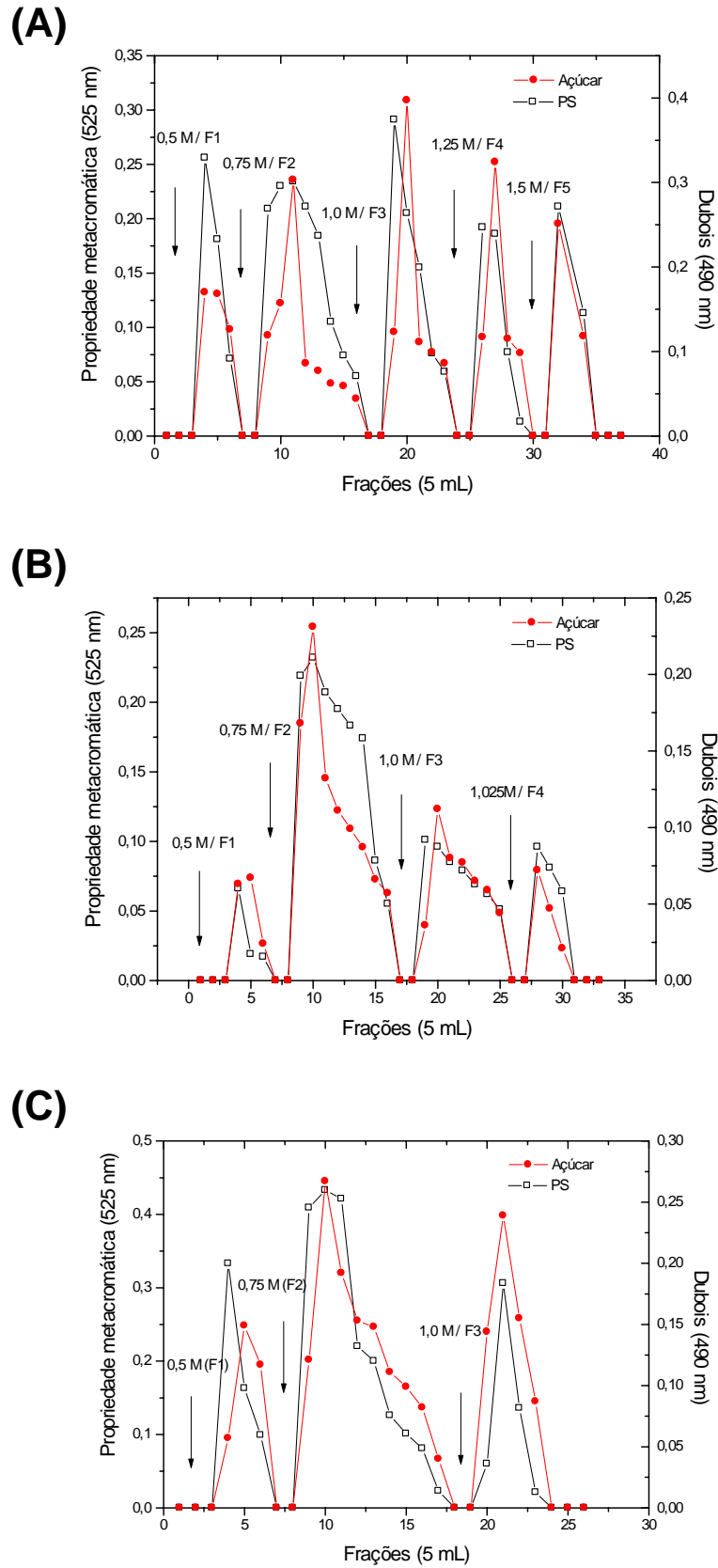


Figura 12. Cromatografia em DEAE-celulose dos polissacarídeos sulfatados, obtidos na 1<sup>a</sup> (A), 2<sup>a</sup> (B) e 3<sup>a</sup> (C) extrações da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*.

Dessa forma, foram constatadas diferenças marcantes nos perfis cromatográficos obtidos das diferentes extrações de ambas as espécies estudadas, principalmente no tocante à quantidade de frações obtidas e intensidade da atividade metacromática. Resultados semelhantes foram obtidos com os PS das algas marinhas verdes *Caulerpa sertularioides* e *C. racemosa*, e da alga vermelha *Solieria filiformes*, quando também foram observadas diferenças significativas entre os perfis cromatográficos obtidos pela coluna de DEAE-celulose, durante o processo de extrações sucessivas (BEZERRA-NETO, 2005; PONTES, 2005; RODRIGUES; FARIAS, 2005).

### **3.3. Eletroforese em gel de agarose**

A eletroforese do extrato bruto e das frações (F1, F2 e F3), obtidos na 1<sup>a</sup> extração de PS da espécie *Halymenia* sp (Figura 13), revelou que tanto o extrato bruto quanto as frações apresentaram um padrão de cargas bem semelhante entre si. Entretanto, não foram obtidas bandas bem definidas, denotando uma baixa purificação. Por outro lado, a eletroforese das mesmas frações, obtidas na 3<sup>a</sup> extração de PS, revelou bandas mais definidas indicando um maior grau de purificação. Foi possível observar ainda, discretas diferenças no padrão de migração das bandas, o que pode ser resultado de pequenas diferenças na densidade de cargas negativas nas moléculas.

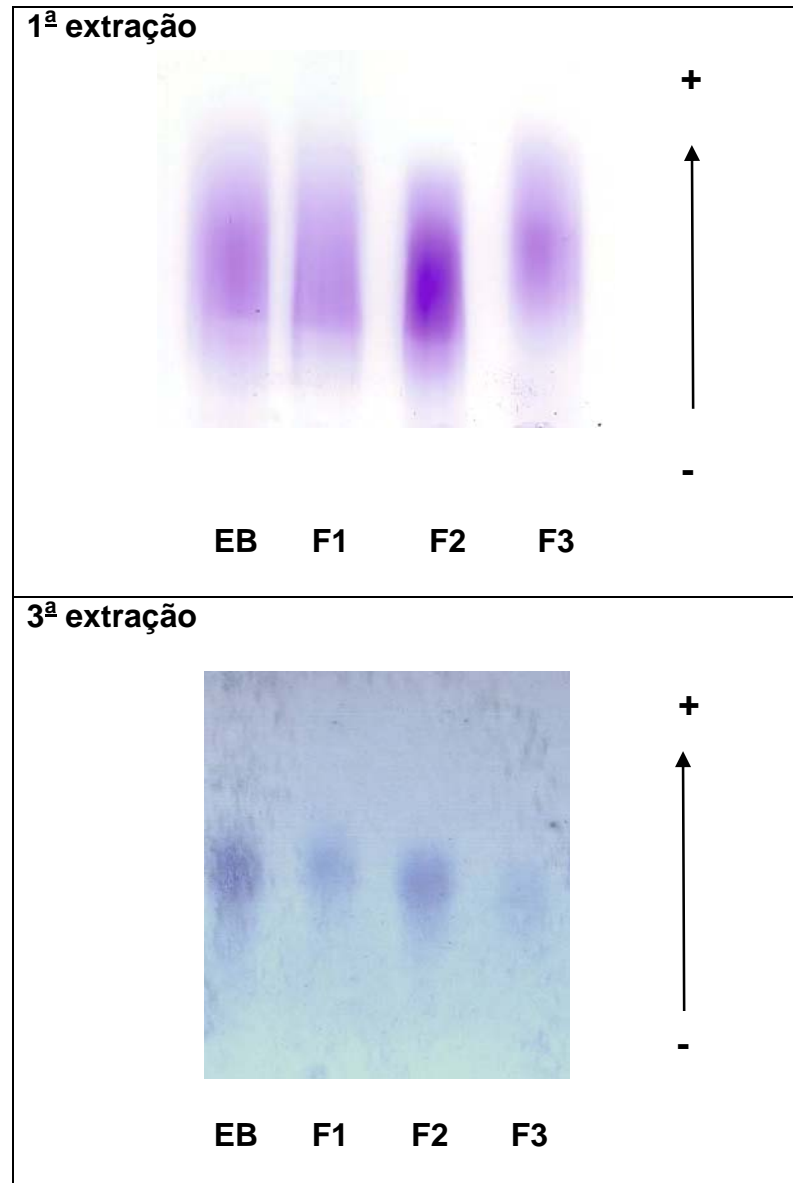


Figura 13. Eletroforeses em gel de agarose 0,5% das frações obtidas na 1ª e 3ª extrações de polissacarídeos sulfatados da espécie *Halymenia* sp. Extrato bruto (EB) e frações F1, F2 e F3.

Comportamento muito parecido também foi observado nas eletroforeses dos PS extraídos nas 1ª e 3ª extrações da espécie *H. pseudofloresia* (Figura 14), principalmente, no tocante à variação no grau de purificação das frações. Uma diferença significativa com relação à espécie *Halymenia* sp, foi o aparecimento de duas bandas no extrato bruto obtido da 3ª extração. As duas bandas obtidas no extrato bruto diferem entre si, claramente, pela densidade

de cargas, sendo uma mais carregada que a outra. O desaparecimento de uma das bandas nas frações pode ser explicado pela falta de interação com a coluna de troca iônica, já que praticamente não é carregada, pois quase não migrou no gel.

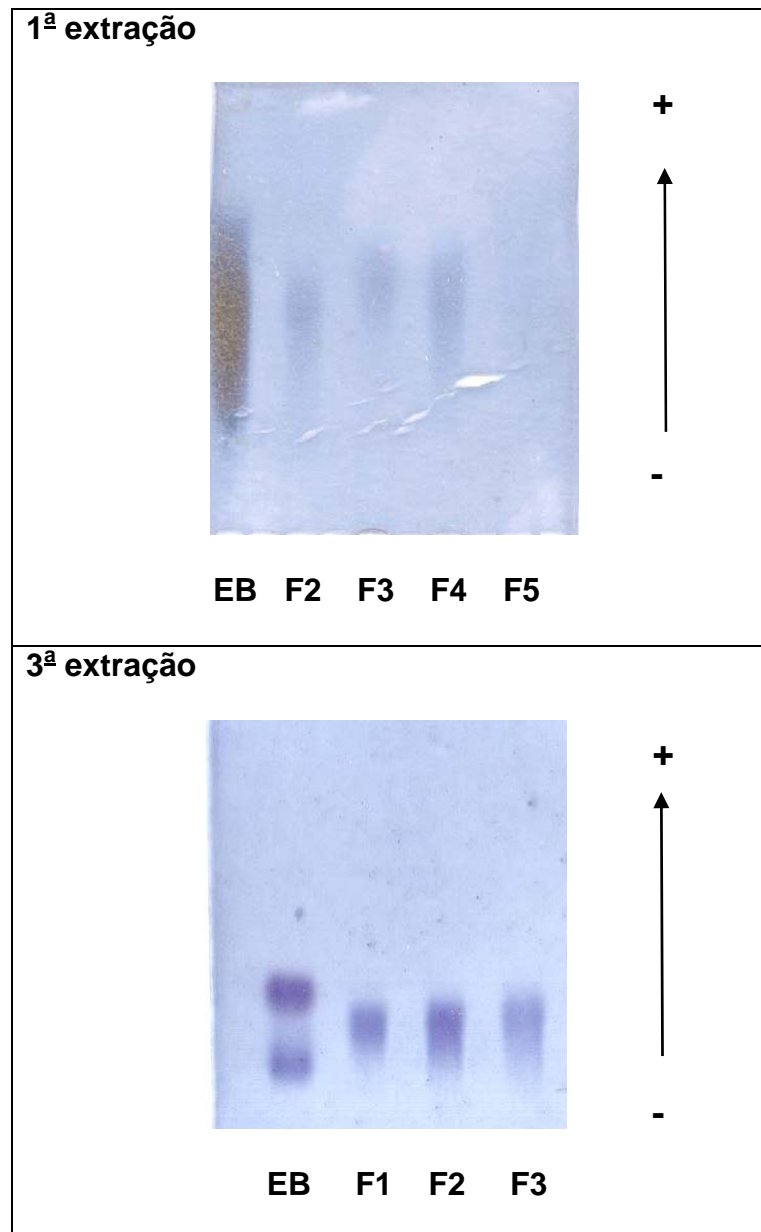


Figura 14. Eletroforeses em gel de agarose 0,5% das frações obtidas na 1ª e 3ª extrações de polissacarídeos sulfatados da espécie *Halymenia pseudofloresia*. Extrato bruto (EB) e frações F1, F2, F3, F4 e F5.

O fato de se obter bandas mais definidas na eletroforese de frações obtidas, a partir da reextração de PS de algas marinhas, pode indicar que o grau de complexidade dessas moléculas talvez esteja diminuindo no decorrer das extrações, o que pode ser bastante útil para a caracterização estrutural desses compostos, já que estas moléculas são muito complexas e heterogêneas (FARIAS et al., 2000).

### 3.4. Atividade anticoagulante (aPTT)

A Tabela 1 mostra o tempo de ativação da tromboplastina (aPTT) em segundos e a atividade anticoagulante das frações, obtidas das algas marinhas vermelhas, expressa em Unidades Internacionais  $\text{UI}\cdot\text{mg}^{-1}$ , tendo como referência um padrão de heparina não-fracionada ( $100 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$ ).

De uma maneira geral, a espécie *H. pseudofloresia* apresentou frações com maior atividade anticoagulante. As frações mais ativas foram obtidas na 1ª extração, sendo maior a F4, eluída com 1,25 M de NaCl, seguida da F2 (0,75 M) e da F3 (1,0 M), cujas atividades foram 464,2; 211,6 e 103,5  $\text{UI}\cdot\text{mg}^{-1}$ , respectivamente. Como é possível observar, a fração F4 foi, pelo menos, 4,6 vezes mais potente que o padrão de heparina utilizado, prolongando o tempo de coagulação do plasma de coelho em, no mínimo, 9 vezes.

Com relação à espécie *Halymenia* sp, a fração mais ativa foi a F2, eluída com 0,75 M de NaCl, em ambas as extrações. No entanto, a atividade dessa fração passou de 110,4 na 1ª extração, para 143,1  $\text{UI}\cdot\text{mg}^{-1}$  na 3ª extração, prolongando, neste último caso, o tempo de coagulação do plasma de coelho em 2,77 vezes.

Tabela 1. Atividade anticoagulante (aPTT) das frações de polissacarídeos sulfatados obtidas algas vermelhas *Halymenia* sp e *Halymenia pseudofloresia* em relação a heparina não fracionada.

| Espécies                               | Extrações      | Frações        | UI.mg <sup>-1</sup> | aPTT (s) | T1/T0 |
|--|----------------|----------------|---------------------|----------|-------|
| <i>Halymenia</i> sp                    | 1 <sup>a</sup> | F1             | 54,1                | 28,0     | 1,05  |
|  |                | F2             | 110,4               | 57,1     | 2,14  |
|  |                | F3             | 79,6                | 41,2     | 1,54  |
|  |                | F4             | 98,8                | 51,1     | 1,91  |
|  | 3 <sup>a</sup> | F1             | 58,2                | 30,1     | 1,13  |
|  |                | F2             | 143,1               | 74,0     | 2,77  |
| F3                                     |                | 73,6           | 38,1                | 1,43     |       |
| <i>H. pseudofloresia</i>               | 1 <sup>a</sup> | F2             | 211,6               | 109,4    | 4,10  |
|  |                | F3             | 103,5               | 53,5     | 2,00  |
|  |                | F4             | 464,2               | 240,0    | 9,00  |
|  |                | F5             | 101,7               | 52,6     | 1,97  |
|  | 3 <sup>a</sup> | F1             | 137,1               | 70,9     | 2,66  |
|  |                | F2             | 96,5                | 49,9     | 1,87  |
|  |                | F3             | 89,2                | 46,1     | 1,73  |
| Heparina                               | -              | Não-fracionada | 100,0               | 51,7     | 1,94  |
| Tempo (s) controle do plasma de coelho | -              | -              | -                   | 26,7     | 1,00  |

Neste trabalho, foram observadas diferenças na atividade anticoagulante das frações obtidas de diferentes extrações, bem como entre as duas espécies de algas testadas.

RODRIGUES; FARIAS (2005) realizaram quatro extrações de PS da alga marinha verde *Caulerpa racemosa*. Os autores observaram uma baixa atividade anticoagulante na maioria das frações, no entanto, as frações F5 e F6, eluídas respectivamente com 1,8 e 2,0 M de NaCl na 4<sup>a</sup> extração, prolongaram o tempo de coagulação do plasma humano em cerca de 6,5

vezes, sendo muito superior as demais que prolongaram, no máximo, 1,8 vezes o referido tempo. Desta forma, durante o processo de extrações sucessivas, é possível extrair PS distintos, com atividades biológicas diferenciadas, possivelmente situados em diferentes camadas do tecido algal.

TORRES (2005) também observou a presença da atividade anticoagulante em PS da alga marinha vermelha *Champia feldimannii*. As frações eluídas na 4ª extração com 1,2 M (F4) e 1,4 M (F5) de NaCl tiveram seus tempos de aPTT prolongados cerca de 6,4 e 4,8 vezes, respectivamente, diferentemente das frações isoladas das demais extrações, cujas atividades anticoagulantes foram bem menores. Por outro lado, PONTES (2005) mostrou que os PS da alga vermelha *Solieria filiformis* praticamente não modificaram o tempo de coagulação sanguínea.

Entretanto, uma baixa atividade biológica não implica na ausência de outras ações bioativas. Recentemente, PS brutos de *Solieria filiformis* foram utilizados em bioensaios como imunoestimulantes no camarão *L. vannamei* infectados com o vírus da mionecrose infecciosa, sendo observado um aumento significativo na sobrevivência dos animais (COSTA et al., 2006).

TALARICO et al. (2004) revelaram que os PS extraídos da alga marinha vermelha *Cryptonemia crenulata* apresentaram uma potente atividade antiviral, apesar de não apresentarem atividade anticoagulante (FARIAS et al., 2000).

FARIAS et al. (2000) reportaram acentuada atividade anticoagulante de uma D-galactana sulfatada extraída da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*. Além disso, esse polissacarídeo também apresentou uma potente atividade antitrombótica em ratos (FARIAS et al., 2001). A atividade pelo modelo intravenoso expressou o seu efeito máximo na dose de 0,2 mg.kg<sup>-1</sup>.

Contudo, quando a dose foi elevada para  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , a atividade foi totalmente abolida, demonstrando que o efeito não foi dose-dependente.

Recentemente, uma galactana sulfatada, extraída da alga marinha vermelha *Schizymenia binderi*, foi fracionada em frações de baixo peso molecular para se avaliar a atividade anticoagulante. As frações obtidas por despolimerização do radical livre apresentaram atividades anticoagulantes similares ao polissacarídeo nativo. Entretanto, quando essas frações foram supersulfatadas e dessulfatadas, seus valores de atividade anticoagulante diferiram significativamente. No primeiro caso, a atividade foi aumentada após a adição de sulfato e, no segundo, a atividade anticoagulante foi completamente abolida após a dessulfatação do composto. Assim, a pesquisa mostrou que o aumento do prolongamento da coagulação sanguínea está diretamente ligado à presença de radicais sulfato na molécula (ZUNIGA et al., 2006).

### 3.5. Efeito imunoestimulante

A Figura 15 mostra a mortalidade semanal dos camarões, em cada tratamento. Como é possível observar, durante a administração dos PS (semanas 1 e 2), não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Entretanto, na terceira semana, ou seja, no período de indução do estresse, o tratamento contendo a dose de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  (T4) apresentou uma mortalidade significativamente menor do que as observadas para os tratamentos T1 (controle) e T2 ( $0,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ), mas não diferindo do T3 ( $1,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ).



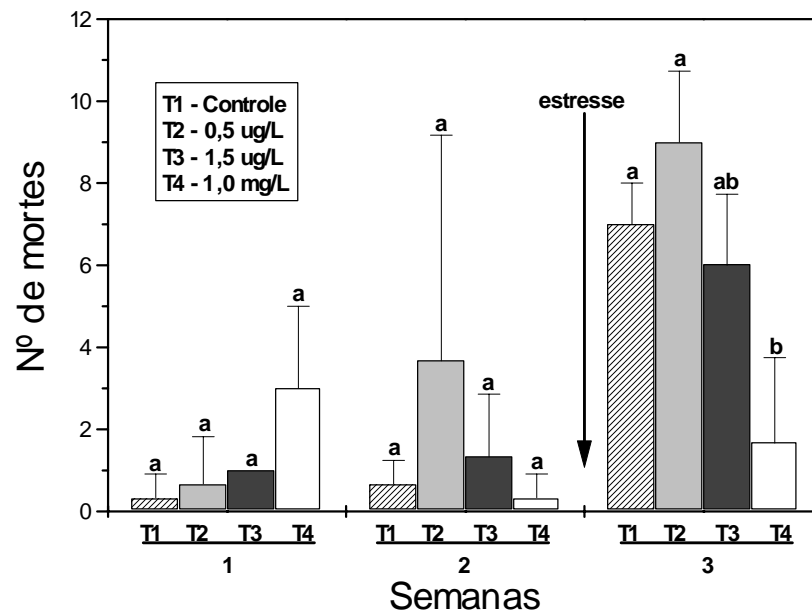


Figura 15. Mortalidade semanal dos camarões *Litopenaeus vannamei*, por tratamento, durante o período experimental. Letras diferentes sobre as barras de erro indicam diferenças significativas ao nível de 5%.

### 3.5.1. Biomassa final viva

A Figura 16 mostra a biomassa final viva obtida nos diferentes tratamentos ao final de 20 dias do período experimental. Os tratamentos T1 (controle) e T2 ( $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) não apresentaram biomassa final viva, pois todos os indivíduos morreram durante o período de indução do estresse. O tratamento T3 ( $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) apresentou uma biomassa final viva de  $9,8 \pm 13,9\text{g}$  e o tratamento T4 ( $1,0 \text{mg.L}^{-1}$ ) apresentou uma biomassa final viva de  $54,2 \pm 10,2\text{g}$  (média  $\pm$  desvio padrão), diferindo significativamente dos demais.

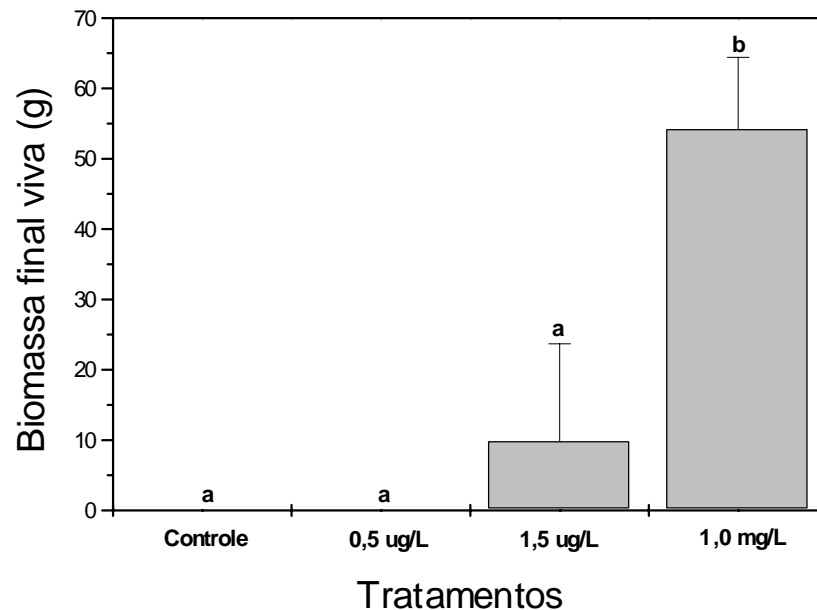


Figura 16. Biomassa final viva dos camarões *Litopenaeus vannamei*, por tratamento, ao término do período experimental. Letras diferentes sobre as barras de erro indicam diferenças significativas ao nível de 5%.

Durante todo o período experimental, também foi observado um alto consumo alimentar por parte dos camarões do tratamento T4 (1,0 mg.L<sup>-1</sup>), apesar de não existirem diferenças significativas entre as médias de ganho de peso nos tratamentos. Além disso, foi verificado um maior número de mudas sugerindo que os animais do tratamento T4 estavam mais estimulados a crescer. Já os camarões dos tratamentos T1, T2 e T3 não realizaram mudas durante o período de indução do estresse.

Resultados semelhantes foram encontrados por BARROSO et al. (*no prelo*) com PS extraídos da alga marinha vermelha *B. occidentalis*, usados em banhos de imersão em pós-larvas do camarão *L. vannamei*. Os autores observaram um aumento significativo na taxa de sobrevivência das pós-larvas

submetidas à dose de  $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ , não havendo diferenças significativas com relação ao ganho de peso.

O aumento do consumo alimentar em camarões, *L. vannamei*, após o uso de PS na dieta é comentado por RIVERA et al. (2002). Os autores relataram que o uso desses polímeros, obtidos da alga marinha parda *Macrocystis pyrifera*, aumentou a taxa de crescimento dos animais através do incremento no consumo alimentar, resultando em uma maior biomassa final na dose de 10% na dieta por peso vivo. Dessa forma, o uso de imunoestimulantes pode significar uma vantagem na indução do crescimento e um efeito protetor em camarões (AZAD et al., 2005).

ITAMI et al. (1998) relataram que o uso de  $\beta$ -glucano é capaz de reduzir o estresse em camarões, *Penaeus japonicus*, em diversas fases de crescimento. Os autores observaram que, após a administração oral desse polissacarídeo, foi possível aumentar a sobrevivência, as taxas de crescimento e a atividade fagocitária dos hemócitos desses animais. Os autores mostraram ainda que a sobrevivência dos camarões também aumentou quando o período de administração do glucano foi prolongado.

CHOTIGEAT et al. (2004) relataram o aumento da sobrevivência do camarão negro *P. monodon*, infectado pelo vírus causador da mancha branca (WSSV), após a administração oral do fuicodam extraído da alga marinha parda *Sargassum polycystium*.

Em peixes, o uso de imunoestimulantes também pode trazer benefícios. Estudos revelaram que a administração oral de  $\beta$ -glucanos em tilápias, *Oreochromis niloticus*, melhorou a taxa de crescimento em relação ao controle, sem a presença do polissacarídeo (PARK, JEONG, 1996).

FARIAS et al. (2004) descreveram o uso de PS obtidos da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* na reversão sexual de tilápias, *O. niloticus*. Os autores observaram que a administração oral de 0,1 mg de PS por grama por peso vivo das pós-larvas resultou em um aumento significativo no ganho de peso e peso final dos indivíduos, após a 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas da reversão.

SAKAI (1999) enfoca que o uso de imunostimulantes se faz importante na tentativa de minimizar o impacto da aquicultura intensiva, como o cultivo de peixes e crustáceos, marinhos e de água doce, em viveiros, tanques ou gaiolas, na busca de aumentar a produtividade por unidade de espaço.

Um estudo relatou que o uso do extrato da levedura *Candida sake* pode ser efetivo no combate ao vírus da mancha branca no camarão *Fenneropenaeus indicus* (SAJEEVAN et al., 2006). Os autores comentaram que a incorporação de 10% do extrato de levedura na dieta na biomassa viva foi capaz de estimular a resposta imune do animal em apenas três dias e inibir a ação do vírus. Além disso, essa mesma dieta também proporcionou uma maior sobrevivência dos animais.

HUANG et al. (2006) reportaram que dietas contendo apenas 0,5 e 1% do extrato obtido da alga marinha *Sargassum fusiforme* foram eficientes em inibir a infecção da bactéria *Vibrio harveyi* no camarão *Fenneropenaeus chinensis*. O estudo mostrou que nesses tratamentos houve uma baixa mortalidade acumulativa após 24 e 30 horas de infecção.

A aplicação de glucanos e probióticos estimula a ação dos hemócitos no sistema de defesa dos camarões. Entretanto, a administração desses compostos requer uma dose correta, evitando danos ao sistema imune do animal, como a formação inadequada da pré-muda em crustáceos (CENAIM,

2001). HAUTON; SMITH (2004) utilizaram cinco imunoestimulantes em lagostas *Homarus gammarus* e também relatam que é muito importante utilizar uma dose ideal, seja ela por imersão ou administração oral, já que uma dose exagerada poderá causar algum risco de toxicidade, principalmente, quando aplicados em longo prazo.

Neste trabalho, o melhor efeito foi obtido com a dose mais elevada ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), no entanto na dose intermediária de  $1,0 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ , muito menor do que a dose máxima utilizada, alguns camarões sobreviveram ao período de indução do estresse. Dessa forma, outros testes utilizando doses menores devem ser realizados na tentativa de se encontrar um melhor efeito.

De acordo com BRICKNELL; DALMO (2005), a administração dos imunoestimulantes na aqüicultura deve envolver intervalos de 4 a 6 semanas, para assim, regular a resposta imune do animal. Além disso, os autores também propõem seu uso em períodos críticos, ou seja, quando o risco de doenças é mais alto.

CAMPA-CÓRDOVA et al. (2002) avaliaram as ações do  $\beta$ -glucano (não-sulfatado) e de um polissacarídeo sulfatado extraído de uma microalga cianofícea, na atividade da enzima superóxido dismutase através de banhos de imersão em juvenis do camarão, *L. vannamei*. A atividade da enzima foi detectada nos hemócitos e no músculo dos animais, após 1, 3 e 6 horas de imersão com os polissacarídeos. Os autores afirmaram que houve um aumento prolongado na atividade oxidativa da enzima, 24 a 48 horas depois de 6 horas de imersão dos camarões com  $\beta$ -glucano, retornando aos valores normais após 72 horas. Além disso, em todos os tempos de imersão (1, 3 e 6 horas), houve

uma resposta de 1,4 a 2 vezes maior em relação aos controles, revelando assim, o mecanismo da ação imunoestimulante.

### 3.5.2. Parâmetros físico-químicos

Durante todo o período experimental, os valores de temperatura variaram de 26,30 a 27,2°C com média de  $26,60 \pm 0,24^\circ\text{C}$ , os de pH de 6,86 a 7,23 com média de  $7,01 \pm 0,27$  e os de oxigênio dissolvido variaram de 4,37 a 6,30  $\text{mg.L}^{-1}$  com média de  $5,30 \pm 0,50 \text{mg.L}^{-1}$ . De uma maneira geral, todas as variáveis mantiveram-se dentro dos limites recomendados para o cultivo de *L. vannamei*.

Os teores de amônia variaram de 0,11 a 2,30  $\text{mg.L}^{-1}$  com média de  $1,34 \pm 0,68 \text{mg.L}^{-1}$ . A concentração de amônia esteve elevada durante a 1ª semana de cultivo. Além disso, os valores encontrados nos tratamentos T1 e T2 diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais. No entanto, essa diferença não se traduziu em um aumento da mortalidade dos camarões nesses dois tratamentos (Figura 17). Na 2ª semana, os valores de amônia nos tratamentos T1 e T2 diferiram significativamente apenas do tratamento T3, não influenciando também na mortalidade dos animais.

Entretanto, no período de estresse, a concentração de amônia decresceu acentuadamente, em todos os tratamentos, em relação aos valores encontrados nas primeiras duas semanas do experimento, chegando a valores quase nulos nos tratamentos T1 e T2. Este fato pode ser explicado pela diminuição acentuada do número de camarões nestes tratamentos devido à mortalidade, o que resultou em um menor aporte de dejetos e restos de ração reduzindo assim a amonificação (ESTEVES, 1988). Esta redução não foi tão

marcante nos tratamentos T3 e T4 devido ao maior número de camarões vivos. No entanto, durante este período, os valores de amônia não apresentaram diferenças significativas ao nível de 5%. Vale salientar que, durante o período de estresse, os camarões do tratamento T4 apresentaram um comportamento bem ativo, enquanto que os animais dos tratamentos T1, T2 e T3 se encontravam agonizando e morrendo, apesar da redução nos teores de amônia.

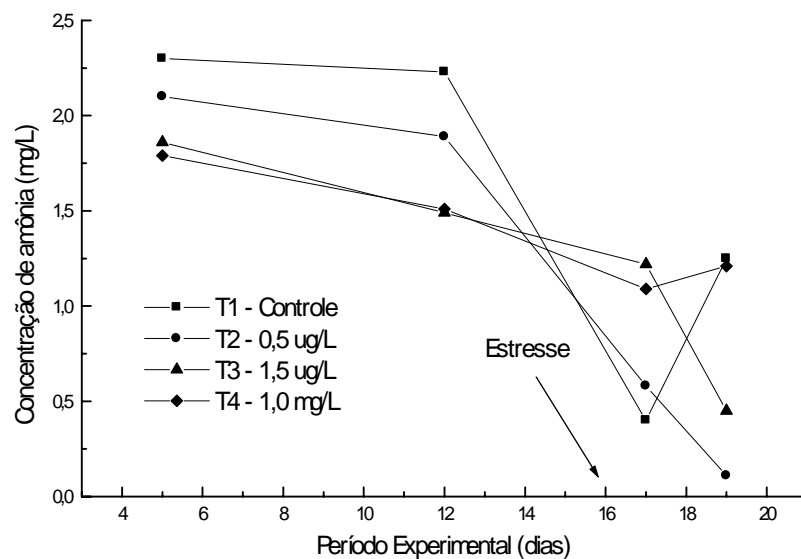


Figura 17. Variação da concentração do nitrogênio amoniacal ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) durante o período de cultivo.

### 3.5.3. Extração de polissacarídeos sulfatados dos camarões

Dos camarões submetidos à extração de PS, só foi possível obter extrato daqueles que foram expostos à dose de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ . Dessa forma, este fato indica uma possível absorção dos PS presentes no músculo dos camarões.

#### **3.5.4. Análise cromatográfica comparativa, em coluna de DEAE-celulose, dos extratos brutos de polissacarídeos sulfatados obtidos das algas e dos camarões**

De uma maneira geral, os perfis cromatográficos obtidos dos extratos das algas e camarões foram bastante semelhantes entre si. As únicas diferenças observadas foram na intensidade da atividade metacromática das frações e na ausência de uma dessas frações na cromatografia do extrato obtido dos camarões.

Como é possível observar no perfil cromatográfico do extrato bruto dos camarões (Figura 18), foram eluídas quatro frações com as mesmas concentrações de NaCl utilizadas na eluição do extrato bruto das algas marinhas, com exceção da fração F5, a qual foi eluída com 1,5 M de NaCl na cromatografia do extrato das algas, não sendo obtida na cromatografia do extrato dos camarões. Além disso, as frações F1 e F3 apresentaram uma metacromasia mais baixa do que aquelas eluídas na cromatografia do extrato das algas.



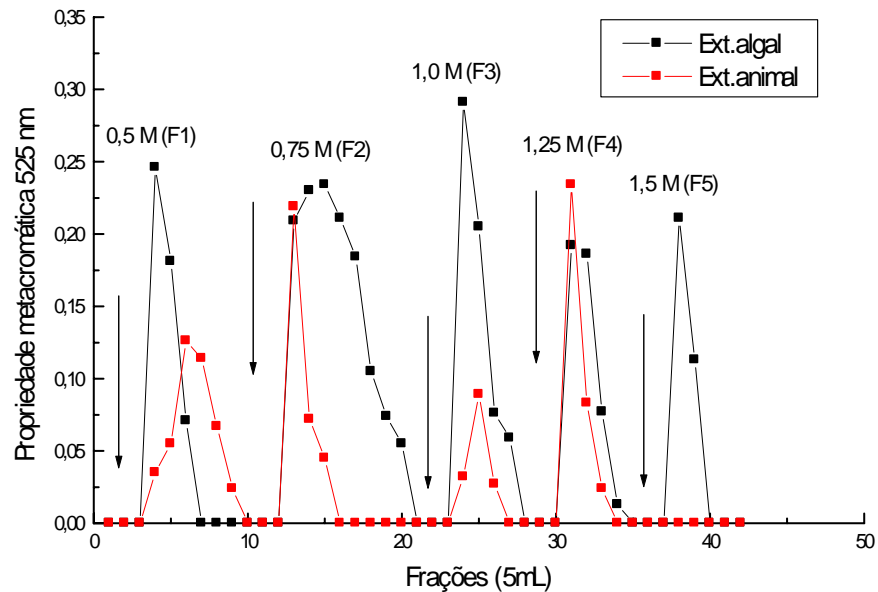


Figura 18. Cromatografias em coluna de DEAE-celulose, dos extratos brutos obtidos dos camarões *Litopenaeus vannamei* e da alga marinha *Halymenia pseudofloresia*.

Assim, os resultados sugerem que, de alguma forma, ocorreu absorção dos PS presentes na alga marinha pelos camarões que foram expostos à dose de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , visto que não foi extraído nenhum material a partir do extrato dos camarões que não foram submetidos ao processo de imersão.

ZHANG et al. (2003) realizaram um estudo para avaliar a atividade imunoestimulante dos PS extraídos da alga marinha vermelha *Porphyra haitanesis*. A fração F2 foi administrada, intraperitonealmente em camundongos, nas doses de  $100, 200$  e  $400 \text{ mg.kg}^{-1}$ , durante 20 dias. Amostras de seis órgãos (fígado, coração, baço, timo, pulmão e cérebro) foram coletadas para investigar o efeito biológico nesses tecidos. Após a análise dos órgãos, os autores constataram um aumento significativo na função imunológica do baço.

A administração oral do  $\beta$ -glucano, um polissacarídeo não-sulfatado, no camarão *P. monodon*, durante três dias, aumentou a atividade da enzima

fenoloxidase da hemolinfa em relação ao controle que não recebeu o glucano (SUPHANTHARIKA et al., 2003). Essa enzima está ligada diretamente ao sistema profenoloxidase, que realiza um importante papel no sistema de defesa dos crustáceos.

As propriedades da molécula também são apontadas por ADACHI et al. (1999) e SANDULA et al. (1999) como importantes para o efeito imunoestimulante. De acordo com os autores, o conteúdo das frações, como o tamanho molecular e a configuração ou estrutura química da molécula, pode influenciar também na atividade da fenoloxidase em camarões.

VARGAS-ALBORES (1995) e ROCH (1999) relatam que a investigação dos hemócitos sanguíneos presentes na hemolinfa de crustáceos decápodes é importante para avaliar o efeito imunoestimulante. CALVACANTE (2004) também afirma que estudos de histologia e contagem de hemócitos também podem ajudar a identificar os efeitos de imunoestimulantes.

Portanto, para dar continuidade a presente pesquisa e esclarecer os mecanismos da atividade imunoestimulante dos extratos da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia*, é necessário o estudo das células presentes na hemolinfa do camarões *L. vannamei* submetidos a banhos de imersão na dose de 1,0 mg.L<sup>-1</sup>.

Em um outro estudo realizado com juvenis do camarão *L. vannamei*, LÓPEZ et al. (2003) reportaram os efeitos fisiológico, nutricional e imunoestimulante de dietas compostas com  $\beta$ -glucano e vitamina C. Os resultados mostraram que, ao final de 40 dias de administração das respectivas dietas houve degradação do  $\beta$ -glucano na glândula digestiva por  $\beta$ -glucanases para produzir energia, a qual permitiu que mais proteínas fossem direcionadas

para o crescimento dos animais. Além disso, foi detectada uma diminuição de trigliceróis e de colesterol na hemolinfa que, provavelmente, foram utilizados pela glândula digestiva. Com relação às células da hemolinfa, foi detectado um aumento significativo nos animais que receberam a dieta formulada com  $\beta$ -glucano e um decréscimo naqueles que receberam dieta com vitamina C.

Neste trabalho, durante as primeiras 96 horas de indução do estresse, os tratamentos que apresentaram as maiores mortalidades foram o T1 e T2, enquanto os tratamentos T3 e T4 foram os que apresentaram os maiores índices de sobrevivência. Entretanto, nas últimas 24 horas do estresse, o tratamento T4 foi o que apresentou a sobrevivência mais significativa. Sem dúvida alguma, os camarões submetidos a este tratamento apresentaram um comportamento bem mais ativo e uma melhor aptidão alimentar, o que sugere que essa dose proporcionou um mecanismo de proteção a esses animais.

SAKAI (1999) afirma que o efeito imunoestimulante pode resultar em uma aceleração do crescimento ou um aumento na sobrevivência dos animais. O autor comenta ainda que a imunestimulação pode ser específica (vacinação) e não-específica. No caso desta última, o efeito imunoestimulante se aplica a uma grande variedade de antígenos.

Uma possível hipótese para a elevada sobrevivência dos camarões expostos à dose de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  é que, uma vez administrados por imersão e absorvidos pelos animais, esses polissacarídeos foram se acumulando, gradativamente, na região muscular. Quando estressados, os camarões utilizaram esses compostos na forma de energia como defesa ao estresse. Possivelmente, esse mecanismo é intermediado pela indução de certas proteínas estimuladas após o tratamento com imunoestimulantes

(KARUNASAGAR et al., 1999). SUNG et al. (1994) e DUGGER (1999) afirmam que a incorporação de polissacarídeos na dieta, durante apenas duas vezes por semana, é suficiente para promover um ótimo de ativação celular do sistema imune não-específico em camarões.

O uso de PS também pode aumentar, significativamente, a atividade fagocítica em camarões. LEE et al. (2003) avaliaram a resposta da atividade fagocítica dos hemócitos do camarão *Penaeus merguensis* através da incorporação dos PS da microalga *Spirulina platensis* na dieta, após a exposição dos animais a algumas bactérias. Os resultados revelaram que a maior atividade fagocítica dos hemócitos foi observada após o quarto dia de exposição ao *Vibrio harveyi* e *Escherichia coli*. Além de verificar o aumento da fagocitose contra as quatro espécies de bactérias utilizadas, a presença de lipopolissacarídeos e peptidoglicanos na microalga testada possibilita a ativação em potencial de macrófagos, também envolvidos em mecanismos de defesa do animal.

### **3.5.5. Eletroforese das frações eluídas a partir do extrato bruto dos camarões**

A Figura 19 apresenta as eletroforeses das frações eluídas com 0,75 M, 1,0 M e 1,25 M de NaCl, obtidas a partir dos extratos brutos dos camarões e das algas. A corrida revelou que as frações (F2 e F3) obtidas a partir do extrato dos camarões apresentaram uma migração eletroforética bastante semelhante à observada para as mesmas frações obtidas da alga marinha *H. pseudofloresia*.

Entretanto, a fração F1 obtida dos camarões migrou mais no gel do que a correspondente das algas e, além disso, apresentou uma banda mais definida, indicando um melhor grau de purificação. Desta forma, não é possível saber ao certo como é a interação destas moléculas no corpo do animal em desencadear um mecanismo de ação-resposta. Provavelmente, esses PS estão se ligando a outros compostos dos camarões tornando-se mais carregados, ou estão sofrendo algum processo de degradação, capaz de simplificá-los em moléculas menores que, conseqüentemente, migram mais facilmente no gel.

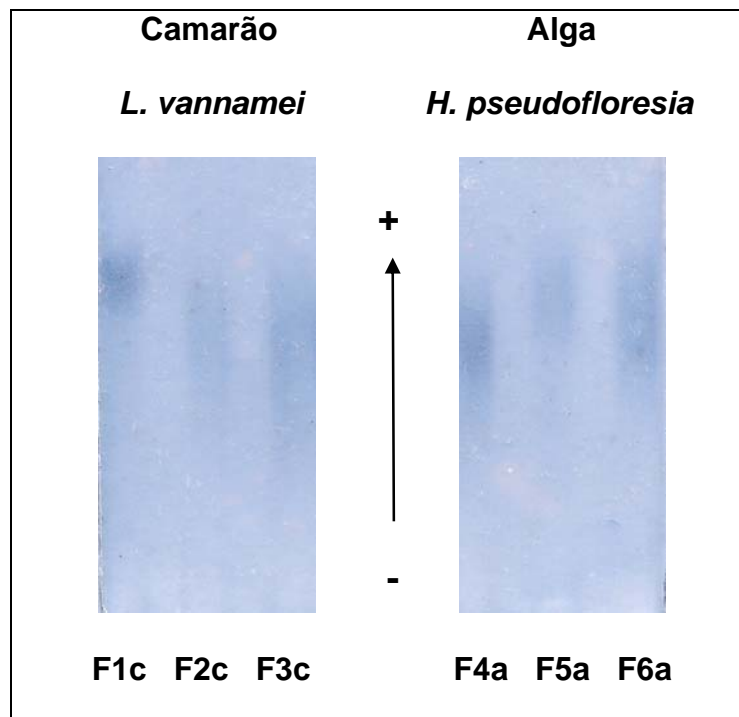


Figura 19. Eletroforeses em gel de agarose das frações obtidas do extrato do camarão *Litopenaeus vannamei* (F1c; F2c e F3c) e da alga marinha *Halymenia pseudofloresia* (F4a, F5a e F6a).

Entretanto, para comprovar tais hipóteses, devem ser comparadas as estruturas químicas da fração eluída com 0,75 M (F1) obtida a partir do extrato

dos camarões com a correspondente obtida do extrato algal. Se houver similaridade entre suas características estruturais, será possível afirmar, que realmente os PS da alga marinha *H. pseudofloresia* foram absorvidos pelo camarão *L. vannamei*.

#### 4. CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho foi possível obter, de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia*, frações de PS com atividade anticoagulante. Dentre essas frações, a mais ativa foi obtida da espécie *H. pseudofloresia*, eluída com 1,25 M de NaCl da coluna de troca iônica, ao contrário da *Halymenia* sp, a qual sua fração F2 (0,75 M) apresentou um discreto aumento da atividade anticoagulante entre suas extrações. Além disso, foi possível obter frações mais puras nas 3<sup>as</sup> extrações nas duas espécies.

Por outro lado, a administração do extrato bruto de PS da espécie *H. pseudofloresia* em camarões *L. vannamei*, através de banhos de imersão na dose de 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, resultou em um aumento significativo da sobrevivência dos animais submetidos a condições de estresse, sugerindo um efeito imunestimulante. A presença desses polissacarídeos foi ainda detectada no músculo dos camarões submetidos à referida dose, os quais apresentaram um perfil cromatográfico, em DEAE-celulose, bastante semelhante ao exibido pelos PS da espécie *H. pseudofloresia*. No entanto, para a comprovação definitiva desse fato, são necessários estudos de caracterização estrutural dessas moléculas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, I.A.; HOLLENBERG, G.J. **Marine algae of California**. Stanford: Stanford University Press, 1976, 827p.

ABCC. Ministério do Meio Ambiente – Estatística da pesca, em 2004, produção estimada por modalidade, segundo as regiões e unidades da federação. Disponível em <<http://www.mercadodapesca.com.br>>. Acesso em: 2 out 2006.

ADACHI, Y.; MIURA, N.N.; OHNO, N.; TAMURA, H.; TANAKA, S.; YADOMAE, T. Enzyme immunoassay system for estimating the ultrastructure of (1,6)-branched (1,3)-beta-glucans. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.39, n.3, p. 225-229, Jul 1999.

ADB-FAO. The world seaweed industry and trade. **Second Fish Market**, v.6, p.3-30, 1983.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. **Molecular Biology of the Cell**, 2 ed., p. 868-676, Garland Publishing, 1989.

ALENCAR, D.B. Polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata*. In: **XXV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**, 1., 2006, Fortaleza. **Anais...Ceará**, 2006. CD-Rom.

ALVES, A.P.; MULLOY B.; DINIZ, J.A.; MOURÃO, P.A.S. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrossomal reaction in sperms of sea urchins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.272, n.11, p.6965-6971, Mar 1997.

ANDERSSON, L.O.; BARROWCLIFFE, T.W.; HOLMER, E.; JOHNSON, E.A.; SIMS, G.E.C. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel-filtration. **Thrombosis Research**, Oxford, v.9, n 6, p.575-583, Dec 1976.

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.

AZAD, I.S.; PANIGRAHI, A.; GOPAL, C.; PAULPANDI, S.; MAHIMA, C.; RAVICHANDRAN, P. Routes of immunostimulation vis-a-vis survival and growth of *Penaeus monodon* postlarvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v.248, n.1-4, p.227-234, Jul 2005.



BARROSO, F.E.C.; RODRIGUES, J.A.G.; TORRES, V.M.; SAMPAIO, A.H.; FARIAS, W.R.L. Effect of sulfated polysaccharides extracted from the red marine alga *Botryocladia occidentalis* in shrimp post-larvae (*Litopenaeus vannamei*). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, 2006. *no prelo*.

BEZERRA-NETO, J.T.B. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides* (Caulerpales, Caulerpaceae)**. 29f. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

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

BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F.; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C.; FISCHER, A.M.; DE AGOSTINE, A.; JOZEFONVICZ, J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs of the Future**, Barcelona, v.20, n.12, p.1237-1249, 1995.

BOLD, H.C.; WYNNE, M.J. **Introduction to the algae**. Structure and Reproduction. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1978. 706 p.

BOURIN, M.C.; LINDAHL, U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. **Biochemical Journal**, London, v.289, p.313-330, Part 2, Jan 1993.

BRICKNELL, 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.

BUCHELI, P.; SAMPAIO, J.; GARCIA, F.; CARRERA, M. A necrose hepatopancreática (NHP) do *Litopenaeus vannamei* – Caracterização e diagnóstico preliminar pelo método de avaliação da deterioração de tecidos (ADT). **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v.14, n.86, p.31-37, Nov/Dez 2004.

BURSON, S.L.; FAHRENBACH, M.J.; FROMMHAGEN, L.H.; RICCARDI, B.A.; BROWN, R.A.; BROCKMAN, J.A.; LEWRY, H.V.; STOKSTAD, E.L.R. Isolation and purification of mactins, heparin-like anticoagulants from Mollusca. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.78, n.22, p.5874-5878, 1956.

BUSCHMANN, A.H.; CORREA, J.A.; WESTERMEIR, R.; HERNANDEZ-GONZALEZ, M.D.; NORAMBUENA, R. Red algal farming in Chile: a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v.194, n.3-4, p.203-220, Mar 2001.

BUSCHMANN, A.H.; WESTERMEIER, R.; RETAMALES, C. Cultivation of *Gracilaria* in the sea-bottom in southern Chile: a review. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.7, n.3, p.291-301, Jun 1995.

CALVACANTE, F.A.M. **Avaliação da contagem total de hemócitos (CTH) e histopatologia de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) alimentados com uma ração sem vitamina C.** 25f. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

CAMPA-CÓRDOVA, A.I.; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N.Y.; DE PHILIPPIS, R.; ASCENCIO, F. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulfated polysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v.12, n.4 p.353-366, Apr 2002.

CÁSSARO, 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.

CENAIM INFORMA, Boletín Informativo Quincenal, **15 de Noviembre de 2001** WSSV y temperatura, inmestimulantes, vitaminas... Como se relaciona todo?. Acesso em: 9 nov 2006.

CHARGAFF, E.; BANCROFT, F.W.; STANLEY-BROWN, M. Studies on the chemistry of blood coagulation II. On the inhibition of blood clotting by substances of high molecular weight. **Journal of Biological Chemistry**, Stanford, v.115, p.155-161, 1936.

CHIANG, Y.M. Cultivation of *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales) in Taiwan. **Proceedings of the International Seaweed Symposium**, v.10, p.569-574, 1981.

CHIANG, Y.M. Seaweed aquaculture and its associated problems in the Republic of China. **TML Conference Proceedings**. v.1, p.99-109, 1984.

CHOTIGEAT, W.; TONGSUPA, S.; SUPAMATAYA, K.; PHONGDARA, A. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v.233, n.1-4, p.23-30, Apr 2004.

COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, J.D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva as feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v.14, n.4, p.333-345, Apr 2003.

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*. Feira Nacional de Camarão. Disponível em: <http://www.agriambi.com.br/Revista>, suplemento 2005, p.25-32. Acesso em: 24 out 2006.

DAMONTE, E.; NEYTS, J.; PUJOL, C.A.; SNOECK, R.; ANDREI, G.; IKEDA, S.; WITVROW, M.; REYMEN, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M.C.; CERZO, A.; COTO, C.E.; DE CLERCQ, E. Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.47, n.12, p.2187-2192, Jun 1994.

DAVIE, E.W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry**, Washington, v.30, n.43, p.10363-10370, Oct 1991.

Diagnostico vírus da mancha branca em criatórios do CE. **O Povo**, Fortaleza, 2005. Disponível em: <<http://www.noolhar.com/opovo/fortaleza/481761.html>>. Acesso em: 8 jun 2005.

DIROSA, M. Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.24, n.2, p.89-102, 1972.

DIXON, P.S.; MURRAY, S.T.; RICHARDSON, W.N.; SCOTT, J.L. Life history studies in Cryptonemiales. **Mem. Soc. Bot. Fr**, p.323-332, 1972.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; 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.

DUGGER, D. Bio-modulation of the non-specific immune response in marine shrimp with beta-glucan. **Aquaculture Magazine**, p.81-89, Jan/Feb 1999.

EISSES, J. Seaweeds in the Indonesian trade. **Indonesia Journal Natural Science**, v.1, n.2-3, p.41-56, 1953.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, FINEP, 1988, 574p.

FAO. **Production and utilization of products from commercial seaweeds**. FAO Information Division, Rome, v.288, 1987. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 25 set 2006.

FAO. Yearbook fishery statistics. **Aquaculture production 2000**. Rome, v. 90/2, 2002, 182p.

FARIAS, W.R.L.; NAZARETH, R.A.; MOURÃO, P.A.S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.86, n.6, p.1540-1546, Dec 2001.

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 fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from

marine algae. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.35, número especial, p.189-195, Oct 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 alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.275, n.38, p.29299-29307, Sep 2000.

FONSECA, C; CARVALHO, T. Resumo do relatório de impacto da mionecrose infecciosa no cultivo do *Litopenaeus vannamei*, **Revista da ABCC**, Recife, ano 6, n.2, p.36-39, Dez 2004.

GANESAN, E.K. **A catalog of benthic marine algae and sea grasses of Venezuela**. Fondo Editorial Conicit, 237p, 1990. Disponível em: <[www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)>. Acesso em: 3 out 2006.

GHOSH, P.; ADHIKARI, U.; GHOSAL, P.K.; PUJOL, C.A.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, Oxford, v.65, n.23, p.3151–3157, Dec 2004.

GLICKSMAN, M. Food hydrocolloids. Natural plant exudates - seaweed extracts, vol. 2, ed., CRC Press, Baton Raton, 1983.

GLYCOWORD. Proteoglycan. Disponível em: <<http://www.gak.co.jp/FCCA/glycoword/PG-A00/PGA00E.html>>. Acesso em: 27 out 2006.

GRAHAM, L.E.; WILCOX, L.W. **Algae**. New York, Prentice Hall. 2000, 736p.

GRAUFFEL, V.; KLOAREG, B.; MABEAU, S.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. New natural polysaccharides with potent antithrombic activity: fucans from brown algae. **Biomaterials**, Oxford, v.10, n.6, p.363-368, Aug 1989.

GUISELEY, K.B.; STANLEY, N.F.; WHITEHOUSE, P.A. Carrageenan. In: **Handbook of water-soluble gums**. New York: McGraw-Hill Book Co, p.5.1-5.30, 1980.

HAUTON, C.; SMITH, V.J. In vitro cytotoxicity of crustacean immunostimulants for lobster (*Homarus gammarus*) granulocytes demonstrated using the neutral red uptake assay. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v.17, n.1, p.65-73, Jul 2004.

HAWKINS, W.W.; LEONARD, V.G. Antipeptic and antithrombic properties of carrageenin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v.60, n.4, p.641-647, 1962.

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J.B.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAWA, N. Inhibition of thrombin by sulfated

polysaccharides isolated from green algae. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1543, n.1, p.86-94, Nov 2000.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; KOJIMA, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: In vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. **Aids Research and Human Retroviruses**, Larchmont, v.12, n.15, p.1463-1471, Oct 1996.

HENNIG, O.L.; GESTEIRA, T.C.V.; ANDRADE, T.P.; CARVALHO, R.L.; CAVALCANTE, F.A.M.; ARAÚJO, P.H.G.; MARTINS, P.C.C.; MARQUES, L.C. Avaliação da contagem total de hemócitos (CTH) na hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado em diferentes salinidades. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca**, Recife, v.2, p.589-593, 1999.

HILTON, K.A. Alginates in textile printing. In: **CIBA Review**. Basel, Switzerland, CIBA, p.19-46, 1969.

HOSHINO, T.; HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; HAMADA, J.; LEE, J.B.; SANKAWA, U. An antiviral active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.21, n.7, p.730-734, Jul 1998.

HUANG, X.; ZHOU, H.Q; ZHANG, H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v.20, n.5, p.750-757, May 2006.

HUSSEIN, M.M.D.; HELMY, W.A.; SALEM, H.M. Biological activities of some galactomannans and their sulfated derivatives. **Phytochemistry**, Oxford, v.48, n.3, p.479-484, Jun 1998.

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 thermophilum*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.164, n.1-4, p.277-288, May 1998.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, Amsterdam, v.154, n.1, p.1-15, Jul 1997.

JOLY, A.B. **Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas**. São Paulo. 1965, p. 406.

JURGENFELD, V. **Suspeita de vírus em camarão de SC**. Valor Econômico-SP. Disponível em: <<http://www.agribands.com.br>>. Acesso em: 21 fev 2005.

KARUNASAGAR, I.; OTTA, S.K.; DEVARAJ, T.N.; SHUBHA, G.; IDDYA, K. Immunostimulation of *Penaeus monodon* through the oral route. **Workshop: Shrimp Immunity and Disease Control Thailand**. Disponível em: <<http://www.fr/incode/htm> 1999>. Acesso em: 5 jan 2004.

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

KONDO, M.; ITAMI, T.; TAKAHASHI, Y.; FUJII, R.; TAMONAGA, S. Ultrastructural and cytochemical characteristics of phagocytes in kuruma prawn. **Fish Pathology**, Tokyo, v.33, n.4, p.421-427, Oct 1998.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L.M.M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. 3ª edição revisada. Jundiaí-SP, 1999, 96p.

KYLIN, H. Die Gattungen der Rhodophyceen. Lund, **Cwck Gleerups Forlag**. 1956, 673p.

LEE, Y.K.; CHEW, P.F.; SOH, B.S.; THAM, L.Y. Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus merguensis* by feeding *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.15, n.4, p.279-287, Jul 2003.

LEITE, E.L.; MEDEIROS, G.L.; ROCHA, H.A.O.; FARIAS, G.G.M.; SILVA, L.F.; CHAVANTE, S.F.; ABREU, L.D.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Structure and pharmacological activity of a sulfated xylofucoglucurinan from the alga *Spatoglossum schroederi*. **Plant Science**, Clare, v.132, n.2, p.215-228, Mar 1998.

LEVRING, T.; HOPPE, H.A.; SCHMID, O.J. **Marine algae. A survey of research and utilization**. Botanical Marine Handbook, v.1, 1969, 421p.

LITTLER, D.S.; LITTLER, M.M. **Caribbean reef plants, an identification guide to the reef plants of the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico**. Washington: Offshore Graphics, 2000, p. 542.

LÓPEZ, N.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; TABOADA, G.; VALENZUELA, M.; PASCUAL, C.; SÁNCHEZ, A.; ROSAS, C. Physiological, nutritional and immunological role of dietary beta-1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v.224, n.1-4, p.223-243, Jun 2003.

MARTINICHEN-HERRERO, J.C.; CARBONERO, E.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirensis* Hale. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.60, n.1, p.7-13, Apr 2005.

MATHEWS, M.B. Polyanionic proteoglycans. In: *Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution*. Kleinzeller; Springer, G.F.; Witmann, H.G. (eds.). Berlin: Springer-Verlag, p.93-125, 1975.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M.L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.28, n.5, p.395-399, Jun 2001.

MAZUMDER, S.; GHOSAL, P.K.; PUJOL, C.A.; CARLUCCI, M.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.31, n.1-3, p.87-95, Dec 2002.

MCNEELY, W.H.; D.J. PETTITT, 1973. Algin. In: **Industrial gums**. 2 ed., New York: Academic Press, p.49-31, 1973.

MEER, W. In: **Handbook of water soluble gums and resins**. New York: McGraw-Hill, p.7.1-7.19, 1980.

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**, Oxford, v.49, n.4, p.491-498, Sep 2002.

MENDES, G.N. Cultivo intensivo de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) em viveiro berçário. In: Simpósio Brasileiro sobre Cultivo de Camarão, 3, 1989, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: MCR Aquacultura Ltda., 1989. 2v. v.2: Camarão de água doce e diversos, p. 363-371.

MENEZES, D.B. **Biologia celular e molecular**. Fortaleza: Stylus Comunicações. 1991, 390p.

MERCADO DA PESCA. **A União Européia estabelece nova barreira para o pescado brasileiro**. Disponível em: <<http://www.mercadodapesca.com.br/noticias2.php?id=3051>>. Acesso em: 2 out 2006.

MERCADO DA PESCA. **Setor de carcinicultura enfrenta a pior crise desde 1992**. Disponível em: <<http://www.mercadodapesca.com.br>>. Acesso em: 2 out 2006.

MIKUS, P.; VALÁSKOVÁ, I.; HAVRÁNEK, E. Analytical characterization of heparin by capillary zone electrophoresis with conductivity detection and polymeric buffer additives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.36, n.3, p.441-446, Nov 2004.

MILES, D.J.C.; POLCHANA, J.; LILLEY, J.H.; KANCHANAKHAN, S.; THOMPSON, K.; ADAMS, A. Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 195, n. 1-2, p. 1-15, Apr 2001.

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

NEW, M.B. Global Aquaculture: current trends and challenges for the 21<sup>st</sup> Century. **World Aquaculture**, Los Angeles, v.30, n.1, p.8-79, Apr 1999.

NEWMAN, S.G.; BULLIS, R.A. An immune mechanisms of shrimp: form, function and practical application, **The new wave, proceedings of the special session on sustainable shrimp culture**. 1<sup>a</sup> ed, Baton Rouge, Flórida, p. 226-237, 2001.

NORAMBUENA, R. Recent trends of seaweed production in Chile. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v.327, p.371-379, Jul 1996.

NORRIS, J.N.; KUGRENS, P. Marine Rhodophyceae: introduction and bibliography. In: ROSOWSKI, J.R.; PARKER, B.C. Selected papers in phycology, **Phycological Society of America**, Lawrence, v.2, p.663-670, 1982.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, C.C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v.12, n.72, p.23-33, jul/ago 2002.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, C.C.; GESTEIRA, T.C.V. Carcinicultura ameaçada – Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v.14, n.83, p.37-51, Mai/Jun 2004.

OLIVEIRA FILHO, E.C. **Algas marinhas bentônicas do Brasil**. 1977. 400f. Tese (Livre docência) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.

OLSON, T.J.; BJORK, I. Regulation of thrombin by antithrombin and heparin cofactor II. In **Thrombin: Structure and Function**. Lawrence J. Berliner (ed). New York: Plenum Press, p.159-217, 1992.

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

PARK, H.H.; JEONG, H.D. Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharide. **Aquaculture**, Amsterdam, v.143, n.2, p.135-143, Jul 1996.

PAVÃO, M.S.G.; AIELLO, K.R.M.; WERNECK, C.C.; SILVA, L.C.F.; VALENTE, A.P.; MULLOY, B.; COLWELL, N.S.; TOLLEFSEN, D.M.; MOURÃO, P.A.S. Highly sulfated dermatan sulfate from ascidians: structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.273, n.43, p.27848-27857, Oct 1998.

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



PEREIRA, A.P.; RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Extração e otimização de rendimento dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Sargassum* sp. In: **VI ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO / VI ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DO CEFETCE**, 1., 2006, Fortaleza. **Anais...CEFETCE: VI ENPPG/VI ENICIT**, 2006. CD-Rom.

PEREIRA, M.S.; MULLOY, B.; MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans: 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.

PEREZ-FARFANTE, I.; KENSLEY, B. Families and genera of the Penaeoid and Sergestoid shrimps, 1997.

PHILLIPS, M.J.; LIN, C.K.; BEVERIDGE, M.C.M. Shrimp culture and the environment lessons from the world's most rapidly expanding warmwater aquaculture sector. In: ICLARM Conference, Manila abstract: p.171-197, 1993.

PLATAFORMA TECNOLÓGICA DO CAMARÃO MARINHO CULTIVADO. **Ministério da Agricultura**, CNPq, ABCC, p.26-28, 2001

PONTES, G.C. **Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Solieraceae, Rhodophyta)**. 30f. Monografia. (Graduação) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4ª edição, 2001, 703p.

RIVERA, G.; YOONG, F.; RIOFRIO, G.B.; REINOSO, B.; HURTADO, F.; MASSUH, P. Inclusion de harina de kelp (*Macrosystis pyrifera*) em alimentos balanceados para camarón. **I Congresso Iberoamericano Virtual de Aqüicultura**, p.244-252, 2002. Disponível em: <<http://www.civa2003.org>>. Acesso em: 19 mai 2004.

ROCH, P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. **Aquaculture**, Amsterdam, v.172, n.1-2, p.125-145, Mar 1999.

ROCHA, I.P.; RODRIGUES, J. A carcinicultura brasileira em 2002. **Revista da ABCC**, Recife, ano 5, n.1, p.30-45, Mar 2003

ROCHA, I.P.; RODRIGUES, J. A carcinicultura brasileira em 2003. **Revista da ABCC**, Recife, ano 6, n.1, p.30-36, 2004.

RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta). In: **XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA**, 1., p. 1693-1701, 2005, Fortaleza. **Anais...Ceará, XIV CONBEP**, 2005. CD-Rom.

ROGERS, D.J.; JURD, K.M.; BLUNDEN, G.; PAOLETTI, S.; ZANETTI, F. Anticoagulant activity of a proteoglycan in extracts of *Codium fragile* ssp. Atlanticum. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.2, n.4, p.357-361, Dec 1990.

ROUND, F.E. **Biologia das algas**. 1965, 263p.

SAJEEVAN, T.P.; PHILIP, R.; SINGH, I.S.B. Immunostimulatory effect of a marine yeast *Candida sake* S165 in *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.257, n.1-4, p.150-155, Jun 2006.

SAKAI, M. Fish immunostimulants: The application for aquaculture. **Faculty of Agriculture Miyazaki University**, p. 19-21, Japan, 1999.

SANDULA, J.; KOGAN, G.; KACURAKOVA, M.; MACHOVA, E. Microbial (1-3)-beta-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.38, n.3, p.247-253, Mar 1999.

SELBY, H.H.; WYNNE, W.H. Agar. In: **Industrial gums**. New York: Academic Press, p.29-48, 1973.

SMITH, H.M. The utilization of seaweeds in the United States. **Bulletin of the United States Bur. Fishery**, v.24, p.169-171, 1905.

SODERHALL, K.; CERENIUS, L. Crustacean immunity. **Annual Review Fish Diseases**, v.2, p.3-23, 1992.

SRITUNYALUCKSANA, K.; SODERHALL, K. The proPO clotting system in crustacean. **Aquaculture**, Amsterdam, v.191, n.1-3, p.53-69, Nov 2000.

SUNG, H.H.; KUO, G.H.; SONG, L. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish Pathology**, Tokyo, v.29, n.1, p.11-17, Mar 1994.

SUPHANTHARIKA, M.; KHUNRAG, P.; THANARDKIT, P.; VERDUYN, C. Preparation of spent brewers yeast beta-glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Bioresource Technology**, Oxford, v.88, n.1, p.55-60, May 2003.

TALARICO, L.B.; PUJOL, C.A.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; NOSEDA, M.E.R.; 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.

TALARICO, L.B.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; SCOLARO, L.A.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus*

*griffithsiae* and *Crytonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.34, n.1-2, p.63-71, Apr 2004.

TAMADA, M. Sulfation of silk fibroin by chlorosulfonic acid and anticoagulant activity. **Biomaterials**, Oxford, v.25, p.377-383, 2004.

TARANTINO, M. Tesouros das águas – a ciência amplia a busca de substâncias extraídas de organismos de mares e rios benéficos à saúde humana. **Isto É**, Rio de Janeiro, v.3, n.1869, p.76-78, Ago 2005.

TAYLOR, W. R. **Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas**. The University of Michigan Press, 1960, 870p.

THOMAS, D.P. Does low molecular weight heparin cause less bleeding? **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.78, n.6, p.1422-1425, Dec 1997.

TORRES, V.M. **Extração, purificação e atividade biológica de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Champia feldmannii***. 28f. Monografia. (Graduação) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

VADSTEIN, O. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. **Aquaculture**, Amsterdam, v.155, n.1-4, p.401-417, Sep 1997.

VAN DEN HOEK, C.; CORTEL-BREEMANN, A.M. Life history studies on Rhodophyceae. II. *Halymenia floresia*. (Clem.) C. Agardh. **Acta Botanica Neerlandia**, Oxford, v.19, n.3, p.341-362, 1970.

VARGAS-ALBORES, F. Sistemas de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). **Cience**, v.46, p.33-45, 1995.

WANG, Y.F.; ZHANG, L.N.; LI, Y.Q.; HOU, X.H.; ZENG, F.B. Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a  $\beta$ -glucan from *Poria cocos* sclerotium. **Carbohydrate Research**, Oxford, v.339, n.15, p.2567-2574, Oct 2004.

WISEMAN, D.R. Observations of the reproductive morphology of the red algal genus *Ochtodes* J. Agardh (Rhizophyllidaceae, Gigartinales). **Phycologia**, Lawrence, v.16, n.1, p.1-8, 1977.

WOMERSLEY, H.B.S. **The marine benthic flora of southern Australian**. Canberra, Australian Biological Resources Study, 508p, 1994. Disponível em: <[www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)>. Acesso em: 3 out 2006.

YU, P.Z.; LI, N.; LIU, X.G.; ZHOU, G.F.; ZHANG, Q.B.; LI, P.C. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Pharmacological Research**, London, v.48, n.6, p.543-549, Dec 2003.

ZANEVELD, J.S. Economic marine algae of tropical South and East Asia and their utilization. **Special Publication IPFC**, v.3, 1955, 55p.

ZANEVELD, J.S. The utilization of marine algae in tropical South and East Asia. **Economic Botany**, Bronx, v.13, n.2, p.89-131, 1959.

ZHANG, Q.B; LI, N.; ZHOU, G.F; LU, X.L; XU, Z.H; LI, Z. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) in aging mice. **Pharmacological Research**, London, v.48, n.2, p.151-155, Aug 2003.

ZHOU, G.; SUN, Y.P; XIN, H.; ZHANG, Y.N; LI, Z.; XU, Z.H. 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.

ZÚNIGA, E.A.; MATSUHIRO, B.; MEJÍAS, E. Preparation of a low-molecular weight fraction by free radical depolymerization of the sulfated galactan from *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta) and its anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.66, n.2, p.208-215, Oct 2006.