

PURIFICAÇÃO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE *IN VITRO* DE GALACTANAS SULFATADAS EXTRAÍDAS DA ALGA MARINHA VERMELHA *Halymenia pseudofloresia*

PURIFICATION AND *IN VITRO* ANTICOAGULANT ACTIVITY OF SULFATED GALACTANS EXTRACTED FROM THE RED MARINE ALGAE *Halymenia pseudofloresia*

José Ariévil Gurgel RODRIGUES* ; Wladimir Ronald Lobo FARIAS

Departamento de Engenharia de Pesca, Laboratório de Bioquímica Marinha,
Universidade Federal do Ceará

*Email: arieviloengpesca@yahoo.com.br

Recebido em: 7 de novembro de 2007

Resumo - A bioprospecção de novos agentes anticoagulantes é justificada devido aos efeitos adversos da heparinoterapia. O objetivo deste trabalho foi purificar e avaliar a atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* pelo uso da técnica das extrações sucessivas. Inicialmente, os polissacarídeos sulfatados totais foram extraídos através de digestão enzimática, sendo realizadas três extrações durante o processo (1 → 3^{a.ext.}). Os PS foram purificados em coluna de troca iônica DEAE-celulose da qual foram obtidas frações (F_n) em diferentes concentrações de NaCl, sendo então dialisadas, concentradas por liofilização e submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,5%. A atividade anticoagulante foi avaliada pelo Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) no modelo *in vitro* utilizando plasma de coelho, sendo os resultados expressos em unidades internacionais (UI mg⁻¹) utilizando-se um padrão de heparina com 100 UI mg⁻¹. O rendimento total foi bastante significativo (63,94%) e a coluna de troca iônica foi eficiente no isolamento e purificação das frações, revelando diferenças entre as extrações. A atividade anticoagulante das frações também diferiu entre as extrações da espécie, sendo seu efeito, pelo menos, 4,6 vezes maior na F₄ (1^{a.ext.}) e menor nas F₂ e F₃ da 3^{a.ext.}, estas últimas com prolongamentos nos tempos de TTPA de apenas 1,87 e 1,73, respectivamente, em relação ao padrão. Entretanto, estudos são necessários a fim de esclarecer as alterações dessa atividade no decorrer do processo de extrações sucessivas, bem como pesquisas referentes ao cultivo e à conservação desses recursos são fundamentais para proteção dos bancos naturais de algas.

Palavras-chave: halymeniaceae, halymeniales, polissacarídeos sulfatados, atividade biológica.

Abstract - The bioprospection of new anticoagulant agents is justified due to adverse effects of heparinization. The aim of this study was to purify and evaluate anticoagulant activity of sulfated galactans of red marine alga *Halymenia pseudofloresia* by the using the technique of successive extractions. Initially, the crude sulfated polysaccharides were extracted by enzymatic digestion, and made three extractions during the process (1 → 3^{a.ext.}). The PS were purified in an ionic exchange DEAE - cellulose column which were obtained fractions (F_n) in different concentrations of NaCl, and then they were dialyzed, concentrated by liofilization and subjected to electrophoresis agarose's gel of 0.5%. The anticoagulant activity was evaluated by Activation Partial Thromboplastin Time (APTT) in *in vitro* model using plasma from rabbits, and the results expressed in international units (IU mg⁻¹) using a standard heparin with 100 IU mg⁻¹. The total yield was significant (63.94%) and the column of ion exchange was effective in the isolation and purification of fractions, revealing differences between the extractions. The anticoagulant activity of fractions also differed between among the extractions of the species, and its effect was at least 4.6 times higher in F₄ (1^{a.ext.}) and lowest in F₂ and F₃ of 3^{a.ext.}, these last results with extensions in times of APTT of only 1.87 and 1.73, respectively, compared to the standard. However, studies are needed to clarify the changes of this activity during the process of successive extractions, and researches about the cultivation and conservation of resources are essential to protection of the natural banks of algae.

Key words - halymeniaceae, halymeniales, sulfated polysaccharides, biological activity.

INTRODUÇÃO

As algas marinhas são ricas em polissacarídeos sulfatados (PS), principalmente, em muitas espécies da divisão Rhodophyta. Os PS são polímeros formados por unidades repetitivas de açúcares e dotados de carga negativa, devido à presença de radicais sulfatos (Mathews, 1975). Entretanto, os PS não ocorrem isoladamente, os quais podem formar compostos de maior complexidade denominados de proteoglicanos (Kjellén & Lindahal, 1991). Dentre as formas de PS mais conhecidas destacam-se as galactanas sulfatadas (GS), as quais ocorrem em invertebrados marinhos, algas marinhas vermelhas e gramíneas marinhas, este último representado por um grupo de plantas vasculares que ocorrem em ambientes marinhos (Aquino et al., 2005).

Nas algas marinhas vermelhas, as GS também são conhecidas como carragenanas e agaranas, compostos que apresentam unidades repetitivas alternadas de ligações β (1 \rightarrow 3) galactopirranose e α (1 \rightarrow 4) galactopirranose (Van De Velde, Pereira & Rollema, 2004) e que são muito utilizados na indústria na forma de géis e espessantes (Glicksman, 1983). A presença de vários grupos hidroxil na molécula permite serem substituídos por ester sulfato, grupo metil e ácido pirúvico, o que contribui para um alta heterogeneidade e complexidade das GS (Usov, 1998).

Várias frações de PS já foram isoladas e caracterizadas a partir de vegetais e animais com propósito de avaliar suas atividades biológicas para o interesse biomédico (Zhang et al., 2003; Souza, Dellias, Melo & Silva, 2007). Dentre elas, a propriedade anticoagulante está entre as atividades mais investigadas no mundo, principalmente, de algas marinhas (Athukorala, Lee, Kim & Jeon, 2007), tais como nas espécies *Botryocladia occidentalis* (Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000), *Gelidium crinale* (Pereira et al., 2005), *Halymenia floresia* (Amorim et al., 2005) e *Lobophora variegata* (Alencar, 2007).

O estudo com diferentes espécies de algas marinhas tem demonstrado que a conformação estrutural varia de espécie para espécie, o que resulta em diferentes atividades anticoagulantes (Dietrich et al., 1995; Haroun-Bouhedja, Mustafa, Siquin & Boisson-Vidal, 2000). Rodrigues & Farias (2006) observaram diferenças marcantes entre frações de PS obtidas a partir de extrações sucessivas de duas espécies do gênero *Halymenia*, sugerindo-se que a técnica pode ser mais uma estratégia importante na identificação de táxons e fármacos. A bioprospecção de novos agentes anticoagulantes é justificada devido aos efeitos colaterais da heparina (extraída de boi e porco) a qual pode levar a hemorragia e queda na contagem de plaquetas (Thomas, 1997) em pacientes com estado de hipercoagulopatia ou sujeitos à trombose causada por diferentes etiologias (Weitz, 1994).

O presente estudo teve como objetivo extrair, purificar e avaliar a atividade anticoagulante *in vitro* em frações de polissacarídeos sulfatados obtidas em diferentes extratos da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* utilizando a técnica das extrações sucessivas.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DA ALGA MARINHA

A coleta de *Halymenia pseudofloresia* (Halymeniaceae, Halymeniales) foi realizada na Praia de Flexeiras, no município de Traíri - CE, em julho de 2005, a partir de exemplares arribados na zona entre-marés. Imediatamente após a coleta, os exemplares foram conduzidos ao Laboratório de Bioquímica Marinha da Universidade Federal do Ceará do Departamento de Engenharia de Pesca, acondicionados em sacos plásticos, onde foram removidos organismos incrustantes e/ou algas epífitas, lavados com água destilada e estocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, o material foi seco em estufa (15 h; $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) para a extração dos PS totais (PST).

EXTRAÇÃO DOS PST DA ALGA MARINHA VERMELHA *H. PSEUDOFLORESIA*

Os PST foram extraídos de acordo com Farias, Valente, Pereira & Mourão (2000) e otimizados segundo Rodrigues & Farias (2006). Brevemente, cinco gramas de alga desidratada em estufa (15 h; $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) e triturada foram hidratadas com 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM (AcNa). Em seguida, foram adicionados 17 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg mL^{-1}), sendo a mistura incubada em banho-maria a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após esse período, o material foi filtrado, centrifugado ($8000 \times g$; 20 min.; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e, ao sobrenadante, foram adicionados três volumes consecutivos de 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, o precipitado foi lavado com 250 mL de CPC 0,05% sendo, em seguida, dissolvido em 174 mL de cloreto de sódio 2 M:etanol absoluto (100:15; v/v) e submetido a uma nova precipitação por, no mínimo, 24 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, através da adição de mais 200 mL de etanol absoluto. Posteriormente o material foi centrifugado e submetido a duas lavagens com 250 mL de etanol a 80% e uma com 150 mL de etanol absoluto. Após esta etapa, o precipitado foi então levado à estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, por um período aproximado de 24 horas para secagem e obtenção do extrato bruto. Os resíduos obtidos das extrações foram submetidos a novas extrações a fim de otimizar o rendimento.

PURIFICAÇÃO DAS GS EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

Os PS brutos (10 mg), de cada extrato, foram dissolvidos em 5 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM (AcNa) e aplicados em uma coluna de

DEAE-celulose de troca iônica (6,5 x 1,5 cm) acoplada a um coletor de frações equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi eluída, passo a passo, com soluções de diferentes concentrações de NaCl (0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50, 1,75 e 2,0 M) também preparadas no mesmo tampão de equilíbrio. O fluxo da coluna foi de 60 mL h⁻¹, sendo coletadas frações de 5 mL. Os PS foram monitorados pela propriedade metacromática com 1,9-azul-dimetilmetileno (DMB) utilizando um espectrofotômetro ajustado a 525 nm.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Após dialisadas exaustivamente contra água destilada, concentradas por liofilização e partindo de alíquotas de 10 µg de PS, as frações foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão 1,3 - acetato diaminopropano (pH 9,0) de acordo com (Vieira, Mulloy & Mourão, 1991). As frações foram aplicadas no gel e a corrida foi realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min. 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% e, finalmente, descorado com uma solução de etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (5:5:0,1; v/v/v).

DETECÇÃO DE CARBOIDRATO TOTAL (CT)

O CT nas frações foi determinado pelo método fenol-sulfúrico segundo Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith (1956). Brevemente, a amostra de 50 µL de solução de polissacarídeo foi incubada por 30 minutos com 350 µL de água destilada, 20 µL de fenol ré-distilado 5% e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após a incubação, a amostra foi levada ao espectrofotômetro para a leitura em 490 nm.

ENSAIOS ANTICOAGULANTES *IN VITRO*

Os testes anticoagulantes foram realizados *in vitro* pelo Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) segundo Andersson, Barrowcliffe, HolmerJohnson & Sims (1976), utilizando plasma citratado de coelho. 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 µL de plasma de coelho, 50 µL de cefalina ativada e 10 µL de solução de PS. Após a incubação, foram adicionados 50 µL de cloreto de cálcio 0,025 M à mistura para ativar a cascata de coagulação. Os testes foram realizados em duplicata, sendo o tempo de coagulação determinado automaticamente pelo coagulômetro (Drake, modelo Quick-timer). A atividade foi

expressa em unidades internacionais por mg (UI mg⁻¹) utilizando como referência uma curva padrão de heparina (100 UI mg⁻¹) da marca comercial Cristália.

RESULTADOS

RENDIMENTO

No total, foram realizadas três extrações e os resultados mostraram que o rendimento foi bastante elevado (63,94%), considerando todas as extrações. Além disso, a maior quantidade de PS foi obtida durante a 1^a extração, sendo decrescentes na 2^a e 3^a extrações, cujos rendimentos foram 58,96; 3,2 e 1,78%, respectivamente.

Os PS de algas marinhas podem ser obtidos através de diferentes metodologias de extração, tais como enzimáticas (Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000), aquosas (Marinho, 2001) e ácidas (Chotigeat, Tongsupa, Supamataya & Phongdara, 2004). O método utilizado neste estudo tem sido empregado para a extração de PS presentes em várias espécies de algas marinhas, sendo os maiores rendimentos obtidos nas Rhodophytas, como nas espécies *Champia feldmanii* (Torres, 2005), *Solieria filiformis* (Pontes, 2005) e outras espécies do gênero *Halymenia* (Rodrigues & Farias, 2006), com rendimentos de 36,2; 46,8; 47,14 e 53,96%, respectivamente. Geralmente, algas verdes (Chlorophytas) têm apresentado rendimentos mais inferiores, como *Caulerpa sertularioides* (7,1%) (Bezerra-Neto, 2005) e *C. racemosa* (13%) (Rodrigues & Farias, 2005).

A primeira extração resultou no maior rendimento de PS de *H. pseudofloresia*, o que também foi observado em outras espécies do gênero (Rodrigues & Farias, 2006). Entretanto, o aumento ou diminuição do rendimento no decorrer das extrações tem sido observado em outras espécies, como na alga marinha parda *Lobophora variegata* (Alencar, 2007), a qual se obteve um rendimento de 28,4% de extrato total. O emprego de diferentes metodologias de extração (Villanueva, Pagba & Montano, 1997), variação sazonal (Bird, 1988) e a utilização de diferentes espécies (Levring, Hoppe & Schmid, 1969) influenciam no rendimento final. Desta forma, o método de extração utilizado foi bastante eficaz na obtenção de PS da alga vermelha *H. pseudofloresia*.

CROMATOGRAFIA DAS GS EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

Os perfis cromatográficos foram bem diferentes entre as extrações. Na 1^a extração (Figura 1, A) foram separadas 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 as maiores propriedades metacromáticas foram observadas nas frações eluídas com 0,75 e 1,0 M, respectivamente, durante o monitoramento em 525 nm.

Na 2^a extração (Figura 1, B) foi possível observar que o perfil cromatográfico se destacou dentre todas as extrações da espécie. O extrato apresentou quatro frações, das quais a F₂, eluída com

0,75 M de sal, obteve a maior metacromasia. A referida fração também foi, praticamente, a maior diferença dentre todas as extrações da espécie. Já na Figura 1, C, 3^a extração, houve o desaparecimento de uma das frações no perfil, o que foi uma característica comum no decorrer do processo de otimização do rendimento desta espécie, apresentando metacromasias semelhantes a 1^a e menores em relação à 2^a extrações. As frações eluídas apresentaram como os maiores picos de PS dentre todas as frações obtidas nas diferentes extrações identificadas no monitoramento com DMB da espécie *H. pseudofloresia*. Em todos os perfis foi observada uma grande presença de carboidratos (Dubois), possivelmente em razão da extração de polissacarídeos neutros.

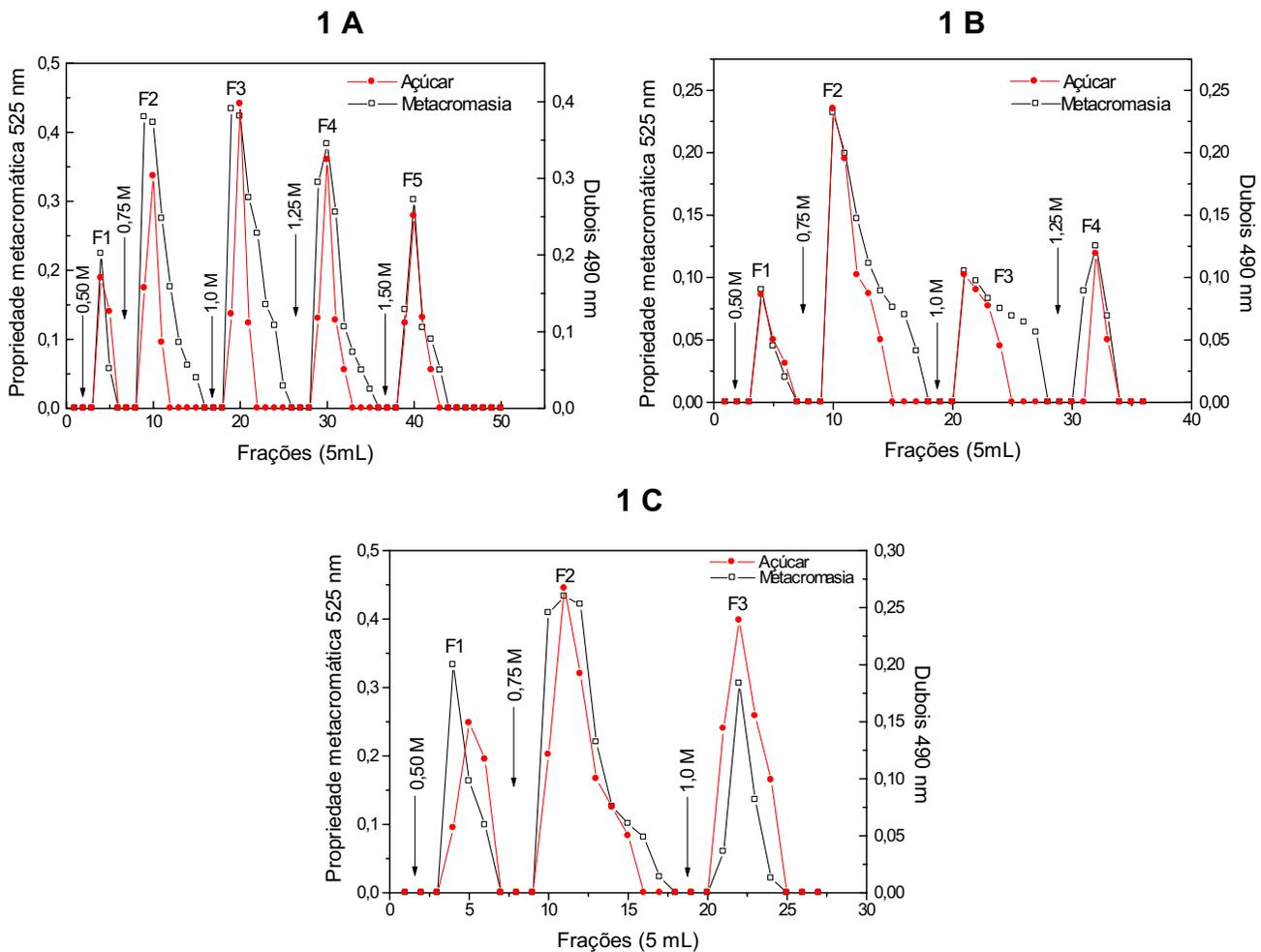


Figura 1 - Cromatografia em DEAE-celulose, por extração, dos polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. A coluna foi equilibrada e lavada com tampão AcNa. Os PS adsorvidos no gel foram eluídos com o tampão de AcNa contendo NaCl em diferentes concentrações (0,50; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,50 M). Os PS foram monitorados com azul dimetilmetileno a 525 nm. (■—■) açúcar total (○—○) propriedade metacromática.

As diferenças marcantes nos perfis cromatográficos obtidos nas diferentes extrações da espécie foram semelhantes com outros trabalhos realizados com extrações sucessivas de PS, utilizando algas marinhas verdes, como *C. racemosa* (Rodrigues & Farias, 2005) e *C. sertularioides* (Bezerra-Neto, 2005), pardas, como na espécie *L. variegata* (Alencar, 2007), e vermelhas, como *S. filiformis* (Pontes, 2005) e outras espécies do gênero *Halymenia* (Rodrigues & Farias, 2006). O fato de se obter perfis comparativamente bem diferentes entre as extrações talvez seja justificado pela extração de PS mais diferenciados (Rodrigues & Farias, 2006).

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DAS FRAÇÕES

A eletroforese em gel de agarose revelou que, no geral, existem diferenças entre o grau de purificação das frações nas diferentes extrações, bem como no padrão de cargas entre o extrato bruto e as frações de PS obtidas de uma mesma extração. As frações F₁, F₂ e F₃ (1^a extração) apresentaram um padrão de corrida com discreta diferença de cargas entre si, as quais não foram obtidas bandas bem definidas no gel, denotando uma baixa purificação.

As frações e os extratos brutos obtidos nas 2^a e 3^a extrações mostraram um maior grau de resolução no decorrer do processo, sendo possível observar a presença de duas bandas bem definidas entre si no terceiro extrato (Figura 2). As frações F₁, F₂ e F₃ apresentaram o mesmo padrão de cargas e com bandas bem definidas, indicando um alto grau de purificação. As duas bandas obtidas no extrato bruto diferiram entre si, claramente, pela densidade de cargas. A ausência de uma das bandas nas frações pode ser explicada pela falta de interação com a coluna de troca iônica DEAE-celulose, já que praticamente não é carregada.

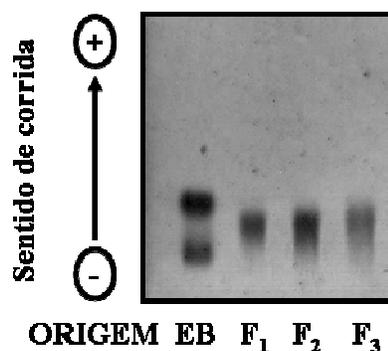


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 0,5% das frações obtidas na 3^a extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. Extrato bruto (EB) e frações (F₁, F₂ e F₃).

Alencar (2007) também obteve resultados semelhantes durante a purificação de fucanas, uma outra forma de PS, da alga marinha parda *L. variegata* utilizando a técnica. A pesquisa também

revelou que é possível obter moléculas diferenciadas e com maior grau de purificação ao longo do processo, uma vez que as fucanas sulfatadas também apresentam uma estrutura química bastante heterogênea. Assim, a resina de DEAE-celulose foi bastante eficiente na purificação das frações de PS de *H. pseudofloresia* e na interação com outros açúcares. As frações obtidas na 3ª extração talvez possam se traduzir numa vantagem na caracterização dessas moléculas, tendo em vista a grande complexidade estrutural das galactanas (Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000).

ENSAIOS ANTICOAGULANTES

A espécie apresentou atividade anticoagulante na maioria de suas frações de PS. As frações mais ativas foram observadas na 1ª extração, sendo maior a F₄, eluída com 1,25 M de NaCl, seguida da F₂ (0,75 M) e F₃ (1,0 M), cujas atividades foram 464,2; 211,6 e 103,5 UI mg⁻¹, respectivamente (Tabela 1). A 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.

Tabela 1 - Atividade anticoagulante (TTPA) das frações de polissacarídeos sulfatados obtidas da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* em relação à heparina não fracionada (HNF).

Extração	Frações	UI mg ⁻¹	TTPA (s)	T ₁ T ₀ ⁻¹
1ª	F ₂	211,6	109,4	4,10
	F ₃	103,5	53,5	2,00
	F ₄	464,2	> 240,0 *	9,00
	F ₅	101,7	52,6	1,97
2ª	F ₂	137,1	70,9	2,66
	F ₁	137,1	70,9	2,66
3ª	F ₂	96,5	49,9	1,87
	F ₃	89,2	46,1	1,73
	Heparina	HNF	100	51,7
Controle	-	-	26,7	1,00

Os valores representam a média de duas determinações; * além do limite de detecção em segundos.

Vários compostos anticoagulantes tem sido isolados e caracterizados de algas marinhas. Farias, Valente, Pereira & Mourão (2000) reportaram acentuada atividade anticoagulante de uma D-galactana sulfatada extraída da alga marinha vermelha *B. occidentalis*, onde o polissacarídeo inibiu a ação da trombina via antitrombina e cofator II da heparina, estes últimos os reguladores plasmáticos da coagulação sanguínea. Esses PS também apresentaram uma potente atividade antitrombótica em ratos, quando a dose de 0,2 mg kg⁻¹ expressou seu efeito máximo pelo modelo

intravenoso (Farias, Nazareth & Mourão, 2001). Fucanas sulfatadas das algas marinhas pardas *Laminaria digitata*, *Pelvetia canaliculata*, *Fucus vesiculosos*, *Sargassum muticum* e *Ascophyllum nodosum* também possuem atividade anticoagulante as quais exercem um efeito inibitório direto sobre a trombina independente da antitrombina (Graufell, Kloareg, Mabeu, Durand & Jozefonvicz, 1989). Neste estudo, os PS obtidos da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia* prolongaram significativamente o tempo de coagulação do plasma de coelho, sendo necessário a realização de mais testes a fim de descrever sua via de ação utilizando plasma humano normal.

A atividade da F₄ (1^a extração) foi bastante superior comparada as demais frações de PS de *H. pseudofloresia*, principalmente da 3^a extração, a qual o efeito anticoagulante das F₂ e F₃ foi, praticamente, abolido em comparação a heparina utilizada.

Compostos bioativos oriundos de algas podem ser obtidos através de várias técnicas. Torres (2005) relatou que extrações sucessivas utilizando duas metodologias de precipitação de PS (CPC e álcool etílico absoluto) obteve diferentes valores dos tempos de TTPA da espécie vermelha *C. feldimanii*. As maiores atividades anticoagulantes foram observadas em duas frações eluídas com 1,2 e 1,4 M de NaCl na 4^a extração pelo método CPC, prolongando os tempos de coagulação em cerca de 6,4 e 4,8 vezes, respectivamente. Duas frações de PS (F₅ e F₆), eluídas na 4^a extração da macroalga verde *C. racemosa*, exibiram elevadas atividades anticoagulantes, as quais prolongaram o tempo de coagulação em cerca de 6,5 vezes (Rodrigues & Farias, 2005), utilizando álcool etílico absoluto como agente precipitante de PS. Extrações sucessivas utilizando precipitações com CPC realizadas por Alencar (2007) da alga marinha parda *L. variegata* mostraram frações de PS com atividades anticoagulantes bem menores, prolongando o tempo de TTPA, no máximo, em apenas 2,1 vezes, quando avaliada *in vitro* uma fração obtida na 1^a extração utilizando plasma humano.

Assim, a técnica das extrações sucessivas permite identificar moléculas bioativas que possam ser exploradas em diversos outros ensaios biológicos de interesse biomédico e expandir sua utilização para outras aplicações biotecnológicas. A baixa atividade anticoagulante de algumas frações de *H. pseudofloresia* não implica na ausência de outras atividades biológicas. A alga marinha vermelha *Cryptonemia crenulata* não apresentou atividade anticoagulante (Farias 2000), mas por outro lado, revelou-se como um potente agente antiviral (Talarico et al., 2004). Recentemente, os PS de *H. pseudofloresia* foram administrados na água de cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, reduzindo significativamente a taxa de mortalidade dos animais durante o estresse (Rodrigues, 2006). O uso de imunoestimulantes resulta na melhoria do crescimento e da sobrevivência dos organismos aquáticos quando expostos a condições adversas de estresse (Sakai, 1999).

As alterações da atividade anticoagulante ao longo do processo talvez possam ser explicadas pelas diferenças químicas estruturais dessas moléculas. Estudos relatam que a atividade anticoagulante está diretamente ligada à densidade de radicais sulfatos na molécula, pois a presença desses grupos sulfatados é que confere a atividade biológica (Nishino, Aizu & Nagumo, 1991). Farias, Valente, Pereira & Mourão (2000) observaram que o posicionamento desses radicais também é muito importante para descrever o efeito da atividade. A estrutura conformacional dos PS varia entre espécies (Dietrich et al., 1995) e sugere-se que a obtenção de moléculas diferenciadas a partir do mesmo tecido da espécie *H. pseudofloresia* resultou em grandes alterações na atividade anticoagulante entre as frações da 1ª extração em relação aos PS obtidos nas extrações 2ª e 3ª, respectivamente. Novos ensaios biológicos mais específicos são necessários a fim de esclarecer as alterações desses efeitos na coagulação ao longo da técnica, relacionando atividade e estrutura.

Desta forma, através da otimização do rendimento a partir de extrações sucessivas e da avaliação dos perfis cromatográficos, é possível extrair PS distintos alocados em diferentes camadas do tecido algal, os quais exibiram diferentes valores de TTPA no decorrer das extrações da alga vermelha *H. pseudofloresia*.

No entanto, é necessária uma avaliação mais detalhada dessas moléculas ao longo de um período anual, já que a produção de PS pode variar de acordo com as condições climáticas ambientais, afetando também a ocorrência da atividade biológica. Assim, é de fundamental importância o manejo adequado desses recursos pesqueiros. Para isso, sugerem-se pesquisas referentes ao cultivo desses organismos para fins comerciais com o intuito de minimizar o impacto sobre os estoques naturais.

CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que frações de polissacarídeos sulfatados obtidas em diferentes extrações da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia* resultaram em diferentes atividades anticoagulantes, das quais a F₄, obtida na 1ª extração, apresentou comparativamente um efeito superior em relação às demais. No entanto, mais estudos são necessários a fim de esclarecer as alterações dessa atividade no decorrer do processo de extrações sucessivas e ações sustentáveis de manejo são extremamente importantes na conservação dos estoques naturais de algas.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho contou com o apoio financeiro do MCT/PADCT/CNPq/CAPES.

REFERÊNCIAS

- Andersson, L.O., Barrowcliffe, T.W., Holmer, E., Johnson, E.A. & Sims, G.E.C. (1976). Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel-filtration. *Thrombosis Research*. 9(6): 575-583.
- Alencar, D.B. (2007). *Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda Lobophora variegata* [Monografia de Graduação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.
- Amorim, R.C.N., Holanda, M.L., Medeiros, S.T., Mourão, P.A.S., Melo, V.M.M. & Benevides, N.M.B. (2005). Structure, antibacterial and anticoagulant activity of a sulfated galactans from the red alga *Halymenia floresia*. In: *XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica*. Águas de Lindóia: CD-Room do XXXIV SBBq, 1.
- Aquino, R.S., Landeira-Fernandez, A.M., Valente, A.P., Andrade, L.R. & Mourão, P.A.S. (2005). Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. *Glycobiology*. 15(1): 11-20.
- Athukorala, Y., Lee, K.W., Kim, S.K. & Jeon, Y.J. (2007). Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology*. 98(9): 1711-1716.
- Bezerra-Neto, J.T.B. (2005). *Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde Caulerpa sertularioides (Caulerpales, Caulerpaceae)*. [Monografia de Graduação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.
- Bird, K.T. (1988). Agar production and quality from *Gracilaria* sp. strain G-16: effects of environmental factors. *Botanica Marina*. 31: 33-39.
- Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K. & Phongdara, A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*. 233(1-4): 23-30.
- Dietrich, C. P., Farias, G. G. M., Abreu, L. R. D., Leite, E. L., Silva, L. F. & Nader, H. B. (1995). A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. *Plant Science*. 108(2): 143-153.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(3): 350-356.

Farias, W.R.L., Nazareth, R.A. & Mourão, P.A.S. (2001). Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. *Thombosis and Haemostasia*. 86(6): 1540-1546.

Farias, W.R.L., Valente, A.P., Pereira, M, S., Mourão, P.S. (2000). Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *Journal of Biological Chemistry*. 275(38): 29299-29307.

Farias, W.R.L. (2000). *Estrutura e atividades anticoagulante e antitrombótica de galactanas sulfatadas da alga marinha vermelha Botryocladia occidentalis* [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Fu, Y.W., Hou, W.Y., Yeh, S.T., Li, C.H. & Chen, J.C. (2007). The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 22(6): 673-685.

Glicksman, M. (1983). Food hydrocolloids. Natural plant exudates – seaweed extracts, vol. 2, ed., CRC Press, Baton Raton.

Graufell, V., Kloareg, B., Mabeu, S., Durand, P. & Jozefonvicz, J. (1989). New natural polysaccharides with potent antithrombotic activity: fucans from brown algae. *Biomateriais*. 10(6): 363-368.

Haroun-Bouhedja, F., Mostafa, E., Sinquin, C., Boisson-Vidal, C. (2000). Relation between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thrombosis Research*. 100(5): 453-459.

Levring, T., Hoppe, H.A. & Schmid, O.J. (1969). Marine algae. A survey of research and utilization. Botanical Marine Handbook, v.1, 1969, 421p.

Kjellén, L. & Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: Structures and interactions. *Annal Review of Biochemistry*. 60: 443-475.

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

Marinho, E. (2001). Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). *Journal of Biotechnology*. 89(1): 81-84.

- Nishino, T., Aizu, Y. & Nagumo, T. (1991). The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. *Thrombosis Research*. 64(6): 723-731.
- Pereira, M.G., Benevides, N.M.B., Melo, M.R.S., Valente, A.P., Melo, F.R. & Mourão, P.A.S. (2005). Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action?. *Carbohydrate Research*. 340(12): 2015-2023.
- Pontes, G.C. (2005). *Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha Solieria filiformis (Solieraceae, Rhodophyta)*. [Monografia de Graduação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.
- Rodrigues, J.A.G. (2006). *Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero Halymenia e seu efeito imunoestimulante no camarão marinho Litopenaeus vannamei* [Dissertação de Mestrado]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.
- Rodrigues, J.A.G. & Farias, W.R.L. (2006). Estudo comparativo de polissacarídeos sulfatados em duas espécies de algas marinhas do gênero *Halymenia* – extração, isolamento e purificação. In: *VI Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação do Cefet*, Fortaleza: CD-Room do VI ENPPG, 1
- Rodrigues, J.A.G. & Farias, W.R.L. (2005). 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*, Fortaleza: CD-Room do XIV CONBEP, 1.
- Sakai, M. (1999). Fish immunostimulants: The application for aquaculture. *Faculty of Agriculture Miyazaki University*, 19-21.
- Souza, M.L.S., Dellias, J.M.M., Melo, F.R. & Silva, L.C.F. (2007). Structural composition and anticoagulant activity of dermatan sulfate from the skin of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 147(3): 387-394.
- Talarico, L.B., Zibetti, R.G.M., Faria, P.C.S., Scolaro, L.A., Duarte, M.E.R., Nosedá, M.D., Pujol, C.A. & Damonte, E.B. (2004). Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactanas from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. Intern. *Journal of Biological Macromoleculas*. 34(1-2): 63-71.

- Thomas, D.P. (1997). Does low molecular weight heparin cause less bleeding?. *Thrombosis and Haemostasia*. 78(6): 1422-1425.
- Torres, V.M. (2005). *Extração, purificação e atividade biológica de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha Champia feldmannii*. [Monografia de Graduação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.
- Usov, A.I. (1998). Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups, *Food Hydrocolloids*. 12(3): 301-308.
- Van De Velde, F., Pereira, L. & Rollema, H.S. (2004). The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohydrate Research*. 339(13): 2309-9979.
- Vieira, R.P., Mulloy, B., Mourão, P.A.S. (1991). Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. Evidence for the presence of 3-O-sulfo- β -D-glucuronosyl residues. *Journal of Biological Chemistry*. 266(21): 13530-13536.
- Villanueva, R.D., Pagba, C.V. & Montano, N.E. (1997). Optimized agar extraction from *Gracilaria eucheumoides* Harvey. *Botanica Marina*. 40: 369-372.
- Weitz, J. (1994). New anticoagulant strategies. Current status and future potentials. *Drugs*. 48: 485-497.
- Zhang, Q.B., Li, N., Zhou, G.F., Lu, X.L., Xu, Z.H. & Li, Z. (2003). *In vivo* antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacology Research*. 48(2): 151-155. ✻