

## Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*<sup>1</sup>

Extraction and anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from the red marine alga *Halymenia pseudofloresia*

José Ariévilto Gurgel Rodrigues<sup>2\*</sup>, Valeska Martins Torres<sup>3</sup>, Daniel Barroso de Alencar<sup>4</sup>, Alexandre Holanda Sampaio<sup>5</sup> e Wladimir Ronald Lobo Farias<sup>5</sup>

**Resumo** - Os polissacarídeos sulfatados (PS) são encontrados em diversos organismos marinhos e suas atividades biológicas têm despertado grande interesse nas ciências médicas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anticoagulante dos PS isolados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. O composto foi obtido enzimaticamente durante a realização de três extrações consecutivas e, em seguida, purificado por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. As frações obtidas foram concentradas por liofilização e submetidas à eletroforese em gel de agarose. A atividade anticoagulante foi avaliada através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) usando plasma de coelho e padrão de heparina (100 UI mg<sup>-1</sup>). As extrações (47,14%) mostraram diferenças marcantes durante o fracionamento e no grau de purificação dessas macromoléculas. A espécie apresentou atividade anticoagulante superior a heparina. O TTPA das frações modificou-se acentuadamente entre as extrações, expressando-se de maneira dose-dependente e sofrendo um decréscimo de 464,2 (1ª extração) para 137,1 UI mg<sup>-1</sup> (3ª extração). Os resultados sugerem que a atividade anticoagulante dos PS isolados de *H. pseudofloresia* foi promovida pela inibição da via intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação. As modificações no TTPA possivelmente se justificaram pelas diferenças conformacionais desses PS e que serão elucidadas através dos mecanismos de ação envolvidos na coagulação e caracterização estrutural desses compostos.

**Palavras-chaves** - Rodofíceas. Macromoléculas sulfatadas. Coagulação sanguínea. Teste do TTPA.

**Abstract** - Sulfated polysaccharides (SP) are found in various marine organisms and their biological activities have aroused great interest in the medical sciences. The objective of this study was to evaluate the anticoagulant activity of SP isolated from the red marine alga *Halymenia pseudofloresia*. Initially, the compound was obtained enzymatically during the performance of three consecutive extractions, and then purified by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose column. The obtained fractions were concentrated by lyophilization and submitted to agarose gel electrophoresis. The anticoagulant activity was evaluated by the activated partial thromboplastin time (APTT) using plasma from rabbits and standard heparin (100 IU mg<sup>-1</sup>). The extractions (47.14%) showed marked differences during the fractionation and in the degree of purification of these macromolecules. The species showed higher activity anticoagulant than that of heparin. However, the fractions' APTT changed up sharply among the extractions, expressing themselves in dose-dependent manner and decreasing from 464.2 (1<sup>st</sup> extraction) to 137.1 IU mg<sup>-1</sup> (3<sup>rd</sup> extraction). The results suggest that the anticoagulant activity of SP isolated from *H. pseudofloresia* be promoted by inhibition intrinsic and/or common pathway the cascade of coagulation. The changes on APTT possibly be justified by differences conformation of these SP and will be elucidated through the mechanisms of action involved on clotting and structural characterization of these compounds.

**Key words** - Rhodophyceae. Sulfated macromolecules. Blood coagulation. APTT test.

\*Autor para correspondência

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 09/03/2008; aprovado em 17/02/2009

Parte da dissertação apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal do Ceará, para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Pesca no ano de 2006

<sup>2</sup>Eng. de Pesca, M. Sc., pesquisador colaborador do Depto de Eng. de Pesca, CCA/UFC, arieviloengpesca@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Eng. de Pesca, pesquisadora colaboradora do Depto de Eng. de Pesca, CCA/UFC, valeskamtorres@gmail.com

<sup>4</sup>Eng. de Pesca, mestrando em Eng. de Pesca, CCA/UFC, daniellpesca@gmail.com

<sup>5</sup>Eng. de Pesca, D. Sc., pesquisadores professores do Depto de Pesca, CCA/UFC, Campus do Pici, Bloco: 825, CEP: 60 356-000, Fortaleza-CE, sampaioa@ufc.br, wladimir@ufc.br

## Introdução

Os polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas complexas e heterogêneas dotadas de radical sulfato presentes em tecidos animais (BURSON et al., 1956; MATHEWS, 1975; MOURÃO; PEREIRA, 1999; SOUZA et al., 2007) e vegetais (algas e gramíneas marinhas) (PAINTER, 1983; PERCIVAL; McDOWELL, 1967; AQUINO et al., 2005).

Nas algas marinhas, Percival e McDowell (1967) relatam que os PS podem estar na forma de fucanas nas algas pardas (Phaeophyceae), de galactanas nas algas vermelhas (Rhodophyceae) e nas algas verdes (Chlorophyceae), os mais encontrados são as arabino-galactanas. Nos vertebrados, os PS são conhecidos como glicosaminoglicanos, destacando-se o condroitim sulfato, heparim sulfato, queratim sulfato, dermatim sulfato e heparina, podendo se apresentar na forma de proteoglicanos (KJELLÉN; LINDAHL, 1991). O estudo dessas macromoléculas é justificado devido suas diversas atividades biológicas, tais como anticoagulante (ATHUKORALA et al., 2007; FARIAS et al., 2000; ZHANG et al., 2008), antitrombótica (FARIAS; NAZARETH; MOURÃO, 2001) e imunoestimulante (ARAÚJO et al., 2008; LIMA, 2007; RODRIGUES, 2006), despertando assim grande interesse nas ciências médicas e na biotecnologia de organismos aquáticos.

O interesse no estudo dessas macromoléculas nos diferentes organismos justifica-se em virtude dos efeitos adversos da heparina (extraída de boi e porco), mundialmente utilizada como agente anticoagulante e antitrombótico na prevenção e tratamento da trombose venosa (MOURÃO; PEREIRA, 1999). O seu uso é limitado devido aos riscos de hemorragia, plaquetopenia e viral (THOMAS, 1997) em pacientes acometidos de hipercoagulopatia ou trombose venosa causada por diferentes etiologias (WEIZT, 1994). Embora atualmente venha sendo utilizada a heparina de baixo peso molecular, sua administração em elevadas doses ainda induzem alguns fatores de risco (THOMAS, 1997).

A bioprospecção de novos substitutos para a heparina já foi descrita para PS isolados e caracterizados, por exemplo, de algas marinhas (ATHUKORALA et al., 2007; FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; ZHANG et al., 2008), invertebrados (BURSON et al., 1956; MOURÃO et al., 1996; MOURÃO; PEREIRA, 1999) e vertebrados (SOUZA et al., 2007).

Vários aspectos sobre estrutura e metabolismo de polissacarídeos de algas marinhas podem ser encontrados em revisões específicas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967) e PS isolados de algumas espécies possuem propriedades anticoagulantes. Farias et al. (2000) e Pereira et al. (2005)

relataram uma acentuada atividade anticoagulante dos PS das algas marinhas vermelhas *Botryocladia occidentalis* e *Gelidium crinale*, respectivamente. As espécies de algas marinhas *Codium fragile* (Chlorophyta) e *Sargassum horneri* (Phaeophyta) demonstraram possuir um grande potencial anticoagulante dentre 22 táxons estudados (ATHUKORALA et al., 2007). Recentemente, Zhang et al. (2008) relataram propriedades anticoagulantes dos PS extraídos da clorofícea *Monostroma latissimum*.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar algumas características dos PS isolados da alga *Halymenia pseudofloresia*. O potencial anticoagulante desses compostos também foi avaliado, contribuindo assim com a bioprospecção de novas macromoléculas com efeitos anticoagulantes.

## Material e métodos

### Alga marinha e extração dos PS

Exemplares arribados de *H. pseudofloresia* Collins & M. Howe (registrado sob n° 0623 no herbário ficológico do Laboratório de Ciências Marinhas – LABOMAR, Universidade Federal do Ceará) foram coletados na praia de Flecheiras-Trairi-Ceará. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Bioquímica Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca/UFC. Inicialmente, as algas foram lavadas com água destilada, secas ao sol, cortadas em pequenos pedaços e armazenadas em frascos para posterior extração dos PS. Posteriormente, os PS totais foram extraídos com uma solução de papaína bruta (30 mg mL<sup>-1</sup>) em 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM (AcNa) a partir de 5 g. Em seguida, o material foi filtrado e após centrifugação (7.965 × g; 20 min.; 10 °C), os PS presentes na mistura foram concentrados por precipitação com 16 mL de cloreto cetilpiridínio (CCP) a 10%, lavado (200 mL; CCP 0,05%) e posteriormente dissolvido em 174 mL de NaCl 2 M: etanol absoluto (100: 15; v/v). Logo após uma precipitação com etanol absoluto (24 h; 4 °C), o material foi lavado com etanol 80% (200 mL; 2 ×), etanol absoluto (200 mL; 1 ×) e seco em estufa durante 24 horas a 60 °C (FARIAS et al., 2000). Os resíduos das extrações foram re-digeridos com papaína a fim de tornar ótimo o rendimento de acordo com Bezerra-Neto (2005) e Torres (2005).

### Purificação por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose)

Inicialmente, o extrato total (10 mg) foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose equilibrada e percolada com o tampão de extração (AcNa) até a completa remoção dos polissacarídeos não

retidos, seguido do fracionamento dos PS por eluição com o mesmo tampão AcNa contendo NaCl em diferentes concentrações (0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25; 1,50; 1,75 e 2,0 M) utilizando um coletor de frações com fluxo ajustado para 60 mL h<sup>-1</sup>. As frações (5 mL) obtidas foram monitoradas através da propriedade metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno (ADM) (FARNDAL; BUTTLE; BARRET, 1986) a 525 nm. As frações de PS obtidas foram dialisadas exaustivamente contra a água destilada, concentradas por liofilização e armazenadas até a realização dos ensaios.

### Detecção de açúcares totais e eletroforese em gel de agarose

A presença de carboidratos totais foi determinada através do método fenol-sulfúrico segundo Dubois et al. (1956). As frações de PS (15 µg) também foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão 1,3 - acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0). 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 *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio 0,1% por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% e descorado com uma solução de etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v/v/v) (DIETRICH; DIETRICH, 1976).

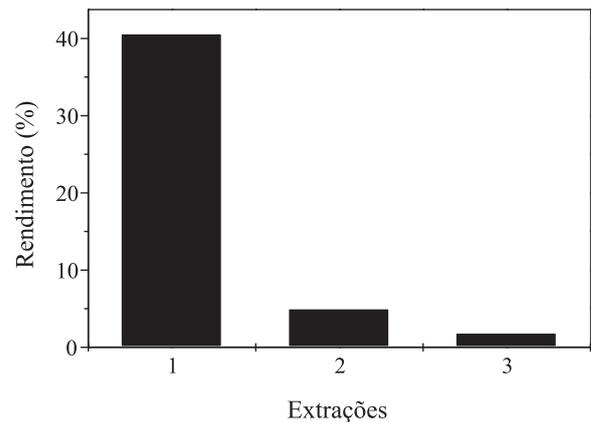
### Ensaio anticoagulantes

A avaliação da atividade anticoagulante foi realizada *in vitro* através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) segundo Anderson et al. (1976). Primeiramente, o sangue foi centrifugado (73,75 × g; 15 min) para a obtenção de um plasma pobre em plaquetas. O teste foi realizado incubando-se a 37 °C por 3 minutos 50 µL de cefatina ativada (Celite, Biolab), 50 µL de plasma de coelho e 10 µL da solução de PS. Após a incubação, foram adicionados 50 µL de cloreto de cálcio 25 mM (Celite, Biolab) à mistura para ativar a cascata de coagulação. O tempo de coagulação foi determinado automaticamente pelo coagulômetro (Drake, modelo Quick-timer) em duplicata e os valores expressos em unidades internacionais por mg (UI mg<sup>-1</sup>) utilizando um padrão de heparina (100 UI mg<sup>-1</sup>).

## Resultados e discussões

### Rendimento

Foram realizadas três extrações (Figura 1). Os rendimentos sofreram decréscimos marcantes no decorrer das extrações de PS de *H. pseudofloresia*, mas totalizando 47,14% de rendimento final. No entanto, a maior



**Figura 1** - Rendimento, por extração, dos PS totais da rodofícea *Halymenia pseudofloresia*. As algas foram secas ao sol e trituradas para a extração dos PS totais com a protease cisteínica papaína em tampão AcNa (pH 5,0).

quantidade de PS foi obtida durante a primeira extração (40,5%). A segunda e terceira extrações resultaram em apenas 4,9 e 1,74%, respectivamente.

Vários métodos são empregados na extração de PS de algas marinhas, tais como enzimáticos, ácidos e aquosos (ATHUKORALA et al., 2007; BEZERRA-NETO, 2005; FARIAS et al., 2000; PERCIVAL; McDOWELL, 1967; ZHANG et al., 2008). Extrações de PS utilizando as algas marinhas vermelhas *Gracilaria cornea* (MELO et al., 2002), *Champia feldmannii* (TORRES, 2005) e uma outra espécie do gênero *Halymenia* (RODRIGUES, 2006) apresentaram rendimentos superiores (22,3; 36,2 e 53,96%, respectivamente) daquele obtido da alga verde *Caulerpa sertularioides* (7,1%) por Bezerra-Neto (2005), mas foram semelhantes às algas pardas *Lobophora variegata* (ALENCAR, 2007) e *Spatoglossum shröderi* (LIMA, 2007), cujos rendimentos foram 28,4 e 38,4%, respectivamente.

Como é possível observar, a grande variação nos rendimentos implica na utilização de diferentes espécies e metodologias empregadas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; VILLANUEVA; PAGBA; MONTANO, 1997). No presente estudo, o rendimento de *H. pseudofloresia* foi semelhante quando comparado às algas vermelhas, demonstrando o potencial da espécie na produção de PS. No entanto, o decréscimo no rendimento no decorrer das extrações foi semelhante quando comparado a outras espécies. Rodrigues (2006) e Lima (2007) também observaram grandes decréscimos no rendimento das espécies *Halymenia* sp e *S. shröderi*, respectivamente, com o uso do método.

Contudo, o aumento ou diminuição no rendimento também pode variar entre diferentes espécies. Torres (2005)

observou um acréscimo no rendimento no decorrer das extrações de PS de *C. feldmannii*, fato também observado por Alencar (2007), estudando a feofíceia *L. variegata*. Algumas espécies de rodofíceas possuem PS (conhecidos como ficocolóides) de alto valor comercial em razão de suas propriedades espessantes, geleificantes e emulsificantes na indústria de alimentos (GLICKSMAN, 1983).

### Purificação por cromatografia de troca iônica DEAE-celulose

Os perfis cromatográficos foram diferentes entre as extrações. Na 1ª extração foram separadas cinco frações eluídas com 0,5 (F I); 0,75 (F II); 1,0 (F III); 1,25 (F IV) e 1,50 M (F V) de NaCl, das quais a F I, F II e F III apresentaram as maiores metacromasias em 525 nm (Figura 2A). Este comportamento diferiu em relação a 2ª e 3ª extrações (Figuras 3B e 3C), quando foram observadas diferenças numéricas e na intensidade metacromática das frações. As frações F I, F II e F III (3ª extração) apresentaram as maiores metacromasias dentre todas as extrações da espécie. Além disso, as frações apresentaram uma presença variável de açúcares totais (Dubois) entre os diferentes extratos de *H. pseudofloresia*.

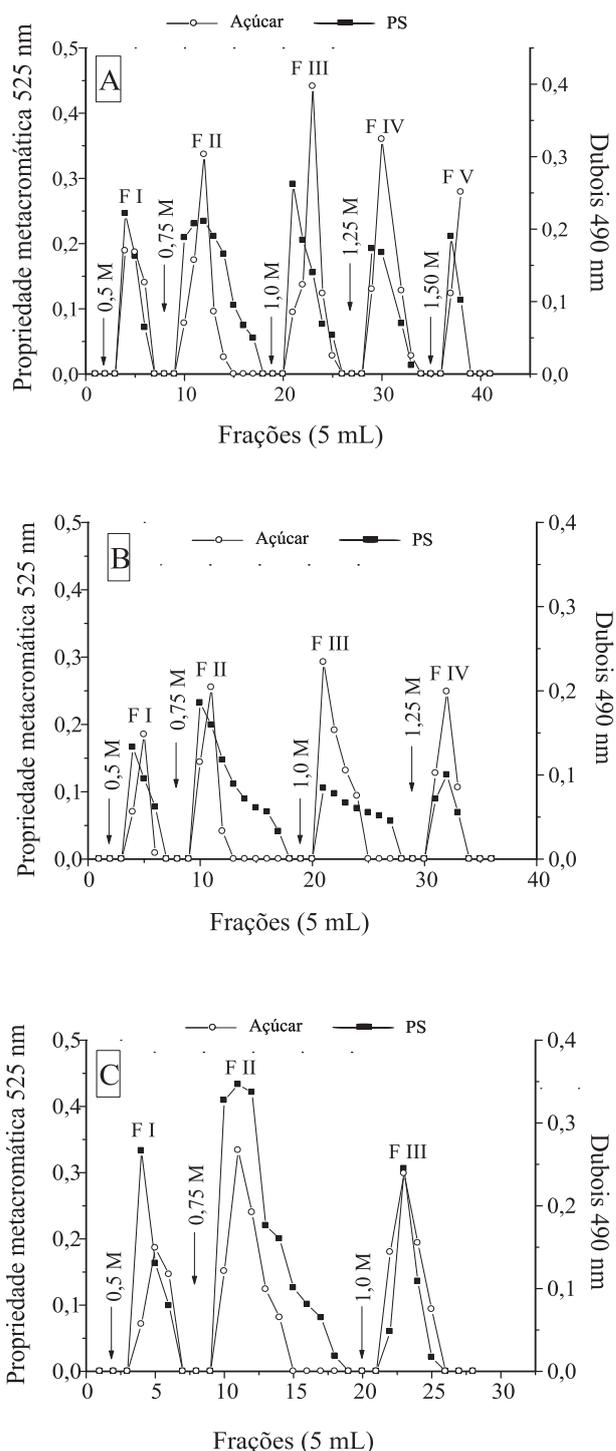
Diferenças marcantes também foram relatadas por Rodrigues (2006), Alencar (2007) e Lima (2007). A razão encontrada para as mudanças nos cromatogramas de PS das espécies *Halymenia* sp, *L. variegata* e *S. shröderi* pode ser atribuída a uma possível extração de PS mais diferenciados, quando a intensidade metacromática das frações diferiu entre as extrações.

Esse comportamento, no entanto, diferiu quando comparado à extração de PS da alga marinha verde *C. sertularioides*, quando perfis semelhantes foram obtidos por Bezerra-Neto (2005), a partir de diferentes extrações.

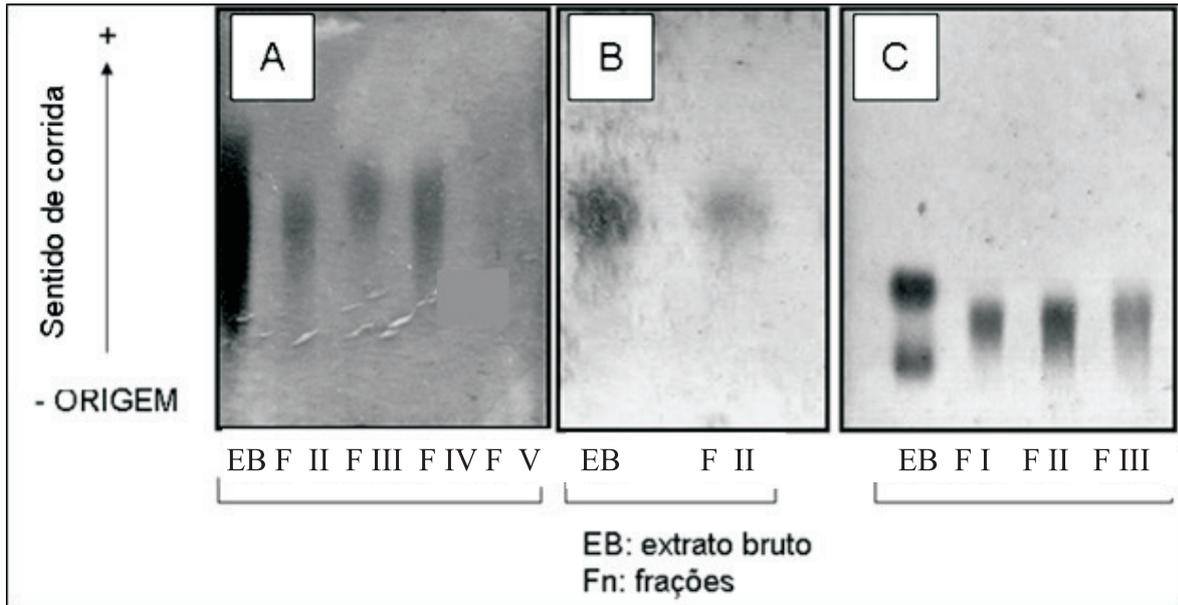
### Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose revelou diferenças entre o grau de purificação das frações, bem como no padrão de cargas entre o extrato bruto (EB) e as frações de PS obtidas de uma única extração (Figura 3). As frações F II; F III e F IV (1ª extração) apresentaram um padrão de cargas semelhantes entre si, porém com uma baixa purificação (Figura 3A). Por sua vez, a F V foi bem menos carregada, já que praticamente não apareceu no gel. Por outro lado, quando as frações obtidas na 2ª e 3ª extrações foram submetidas à eletroforese (Figuras 3B e 3C), observou-se a ocorrência de bandas homogêneas, indicando uma maior resolução.

Rodrigues (2006) e Alencar (2007) também obtiveram resultados semelhantes durante a purificação



**Figura 2** - Cromatogramas da 1ª (A) 2ª (B) e 3ª (C) extrações em coluna de troca iônica DEAE-celulose de *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 através da propriedade metacromática usando o azul-dimetilmetileno (ADM) a 525 nm. (—○—) açúcar total (Dubois); (—■—) propriedade metacromática (PS).



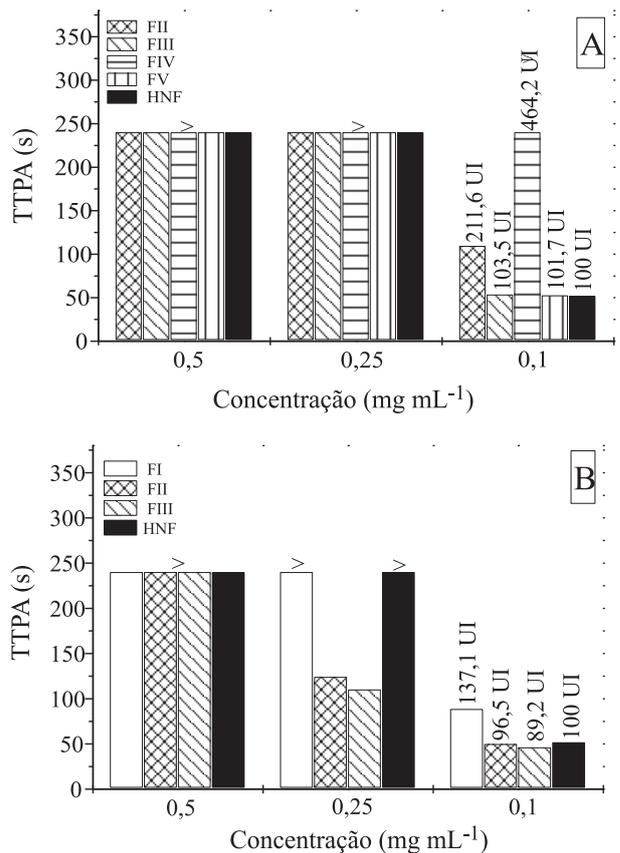
**Figura 3** - Eletroforese em gel de agarose das frações obtidas na 1ª (3A), 2ª (3B) e 3ª (3C) extrações de PS da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. O extrato bruto (EB) e as frações (F I; F II; F III; F IV e F V) presentes no gel foram corados com azul de toluidina 0,1%.

de PS das algas marinhas *Halymenia* sp e *L. variegata*, respectivamente. Os autores observaram que o grau de definição aumentou ao longo do processo, uma vez que essas macromoléculas apresentam uma estrutura química bastante heterogênea. Assim, como foi observada, a coluna de troca iônica DEAE-celulose foi eficiente na purificação das frações de PS de *H. pseudofloresia*. Por outro lado, a 3ª extração revelou um padrão eletroforético distinto entre o EB e as frações (Figura 3C). As diferenças das bandas do EB e a ausência de uma delas quando eluídas no gel de DEAE-celulose reforça o fato da elevada metacromasia (Figura 3C), promovendo uma maior interação da banda inferior (mais carregada) em relação a superior. Possivelmente, as diferenças encontradas dessas macromoléculas se traduzem numa vantagem na caracterização desses compostos. A complexidade e a heterogeneidade desses polímeros dificultam a elucidação de suas estruturas químicas (FARIAS et al., 2000; PERCIVAL; McDOWELL, 1967; PEREIRA et al., 2005; ZHANG et al., 2008).

Desta forma, as semelhanças e/ou diferenças encontradas durante o fracionamento e no perfil eletroforético durante o emprego da técnica, seria talvez mais como uma estratégia importante na identificação taxonômica desses organismos (RODRIGUES, 2006).

**Atividade anticoagulante**

A espécie apresentou frações com atividade anticoagulante. A fração F IV (1,25 M) foi a mais ativa (1ª extração), seguida da F II e F III, cujas



**Figura 4** - Atividade anticoagulante (TTPA) das frações de PS obtidas na 1ª (A) e 3ª (B) extrações da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* em relação à heparina não-fracionada (HNF). (>) além do limite de detecção em segundos; (UI) unidades internacionais.

atividades foram 464,2; 211,6 e 103,5 UI mg<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 4A). Contudo, a atividade decresceu acentuadamente na 2ª e 3ª extrações (Figura 4B), prolongando, no máximo, 2,66 vezes (137,1 UI mg<sup>-1</sup>) o TTPA do plasma de coelho. Desta forma, a atividade observada na maioria das frações isoladas de *H. pseudofloresia* superou ao padrão de heparina utilizado (100 UI mg<sup>-1</sup>). Geralmente, um elevado prolongamento no TTPA sugere uma inibição da via intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação (ATHUKORALA et al., 2007; ZHANG et al., 2008).

Os resultados deste trabalho sugerem que é possível obter PS com diferentes atividades anticoagulantes (TTPA) utilizando extrações consecutivas do mesmo material. O emprego da papaína na extração consecutiva de PS da rodofícea *C. feldmannii*, Torres (2005) observou os maiores prolongamentos nos TTPAs (6,4 e 4,8 vezes) a partir de alíquotas (5 µL) de duas frações eluídas na 4ª extração a partir do fracionamento desses compostos em DEAE-celulose em relação ao tempo normal. Uma outra espécie do gênero *Halymenia* também apresentou atividade anticoagulante superior a heparina. Entretanto, a atividade foi amplificada de 110,4 (1ª extração) para 143,1 UI mg<sup>-1</sup> na 3ª extração, prolongando, neste último caso, o tempo de coagulação do plasma de coelho em 2,77 vezes (RODRIGUES, 2006). O emprego da técnica tem sido uma ferramenta importante na identificação de novas macromoléculas com atividade anticoagulante (ALENCAR, 2007; BEZERRA-NETO, 2005; TORRES, 2005).

Neste trabalho, o efeito dos PS de *H. pseudofloresia* na coagulação foi, pelo menos, 4,6 vezes mais potente que o padrão de heparina utilizado (Figura 4A). Curiosamente, a maior atividade foi observada na 1ª extração na qual o rendimento de PS também foi majoritário (Figura 2), mas não foi dependente do acréscimo da propriedade metacromática no decorrer das diferentes extrações (Figuras 2 e 4). A atividade anticoagulante também foi amplificada pelo aumento da concentração de PS (dose-dependente) (Figura 4), sugerindo-se a realização de outros modelos biológicos.

Mourão e Pereira (1999) reportam que não basta apenas comparar uma requerida dose para uma ação antitrombótica, mas também a persistência do efeito, níveis de circulação no plasma, correlação entre a ação anticoagulante e antitrombótica, além da disponibilidade e absorção quando a droga é administrada em diferentes rotas, e modelos de experimentação animal são ferramentas importantes para avaliar os efeitos de diferentes polissacarídeos no desenvolvimento de novas drogas.

Desta forma, as alterações na atividade entre as extrações poderão ser mais bem compreendidas através

da elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na coagulação e da caracterização estrutural desses polímeros. Farias et al. (2000) reportaram acentuada atividade anticoagulante de uma D-galactana sulfatada extraída da alga marinha vermelha *B. occidentalis*. A atividade foi mediada pela inibição da trombina via antitrombina e cofator II da heparina (inibidores plasmáticos) pela presença de dois ésteres de sulfato em um único resíduo de galactose. Além disso, esse polissacarídeo também apresentou uma potente atividade antitrombótica em ratos, quando a dose de 0,2 mg kg<sup>-1</sup> expressou seu efeito máximo pelo modelo intravenoso (FARIAS; NAZARETH; MOURÃO, 2001), demonstrando que um mesmo composto pode exibir diferentes atividades biológicas.

Zhang et al. (2008) observaram que os PS extraídos da alga marinha verde *M. latissimum* exibiram diferentes efeitos anticoagulantes quando o tamanho molecular foi reduzido, demonstrando que a atividade também pode ser mediada pelo tamanho do composto na inibição mais efetiva da trombina. O estudo das características químicas e estruturais dessas macromoléculas é de grande importância para elucidar o efeito do composto na coagulação (ATHUKORALA et al., 2007; FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; ZHANG et al., 2008). As diferenças no grau de resolução desses polissacarídeos (Figura 3) pode ser o resultado de mudanças dos padrões químicos nas estruturas dessas moléculas. Tal fato poderá ajudar na melhor compreensão do mecanismo relacionado entre as funções biológicas e estruturas desses compostos (MOURÃO; PEREIRA, 1999; ZHANG et al., 2008).

Assim, a otimização no rendimento de PS da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia* resultou em frações com atividade anticoagulante ao longo de diferentes extrações. Por outro lado, 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, seria indicado (BIRD, 1988). Estudos relacionados ao cultivo desses organismos também são fundamentais como forma sustentável de utilização, em proteção aos bancos naturais de algas.

## Conclusão

Os polissacarídeos sulfatados isolados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* apresentaram atividade anticoagulante. No entanto, a atividade modificou-se acentuadamente entre as extrações, possivelmente em razão da mudança da conformação estrutural dessas macromoléculas. Acredita-se que através dos mecanismos de ação envolvidos na coagulação será possível esclarecer tal fato.

## Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior, CAPES.

## Referências

ALENCAR, D. B. **Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata***. 2007. 30 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ANDERSON, L. O. et al. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel-filtration. **Thrombosis Research**, v. 09, n. 06, p. 575-583, 1976.

AQUINO, R. S. et al. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, v. 15, n. 01, p. 11-20, 2005.

ARAÚJO, G. S. et al. Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 04, p. 548-554, 2008.

ATHUKORALA, Y. et al. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 09, p. 1711-1716, 2007.

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

BIRD, K. T. Agar production and quality from *Gracilaria* sp. strain G-16: effects of environmental factors. **Botanica Marina**, v. 31, n. 01, p. 33-39, 1988.

BURSON, S. L. et al. Isolation and purification of mactins, heparin-like anticoagulants from Mollusca. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 22, p. 5874-5878, 1956.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 02, p. 645-647, 1976.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 03, p. 350-356, 1956.

FARIAS, W. R. L. et al. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FARIAS, W. R. L.; NAZARETH, R. A.; MOURÃO, P. A. S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thrombosis and Homeostasis**, v. 86, n. 06, p. 1540-1546, 2001.

FARNDAL, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochemistry et Biophysics Acta**, v. 883, n. 02, p. 173-177, 1986.

GLICKSMAN, M. **Food hydrocolloids**. Natural plant exudates – seaweed extracts. Baton Raton: CRC Press, 1983.

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

LIMA, P. C. W. C. **Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum shroederi* sobre o aumento da resistência do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* submetido a situações de estresse**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MATHEWS, M. B. Polyanionic proteoglycans. In: KLEINZELLER; SPRINGER, G. F.; WITMANN, H. G. **Connective tissue: macromolecular structure and evolution**. Berlin: Springer-Verlag, 1975. p. 93-125.

MELO, M. R. S. et al. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 04, p. 491-498, 2002.

MOURÃO, P. A. S. et al. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm: sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high antithrombotic action. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 39, p. 23973-23984, 1996.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends Cardiovascular Medicine**, v. 09, n. 08, p. 225-232, 1999.

PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983. 195-285.

PEREIRA, M. G. et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action?. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 12, p. 2015-2023, 2005.

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. New York: Academic Press, 1967. 219 p.

RODRIGUES, J. A. G. **Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e seu efeito imunestimulante no camarão marinho *Litopenaeus vannamei***. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

THOMAS, D. P. Does low molecular weight heparin cause less bleeding? **Thrombosis and Haemostasis**, v. 78, n. 06, p. 1422-1425, 1997.

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

VILLANUEVA, R. D.; PAGBA, C. V.; MONTANO, N. E. Optimized agar extraction from *Gracilaria eucheumoides*. Harvey. **Botanica Marina**, v. 40, n. 05, p. 369-372, 1997.

SOUZA, M. L. S. et al. 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**, v. 147, n. 03, p. 387-394, 2007.

WEITZ, J. **New anticoagulant strategies**. Current status and future potentials. **Drugs**, v. 48, n. 04, p. 485-497, 1994.

ZHANG, H. J. et al. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 03, p. 428-434, 2008.