

Heparinoides naturais isolados de rodofíceas (*Halymenia* sp.) arribadas na costa cearense

José Ariévil Gurgel Rodrigues, Valeska Martins Torres, Daniel Barroso de Alencar, Alexandre Holanda Sampaio e Wladimir Ronald Lobo Farias*

Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Av. Humberto Monte, s/n, Bloco 927, 60356-000, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: wladimir@ufc.br

RESUMO. A crescente carência de heparina (HEP) motiva a busca por fontes alternativas de novos anticoagulantes naturais. Objetivou-se avaliar a atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados (PS) isolados de uma rodofícea do gênero *Halymenia*, nativa do litoral cearense, Brasil. Os PS totais foram obtidos por digestões consecutivas com papaína em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM, seguidas 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 0,5%. Os ensaios anticoagulantes foram realizados pelo tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), usando-se plasma de coelho e uma curva padrão de HEP (100 UI mg⁻¹). As extrações (53,96%) mostraram diferenças marcantes durante o fracionamento e no grau de resolução dos PS. A espécie apresentou PS com atividade anticoagulante superior a HEP. O TTPA das frações modificou-se acentuadamente entre as extrações, expressando-se de maneira dose-dependente e sofrendo um acréscimo de 110,40 (1ª extração) para 143,10 UI mg⁻¹ (3ª extração). Os resultados sugerem que a atividade anticoagulante dos PS isolados de *Halymenia* sp. foi promovida pela inibição da via intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação. As modificações no TTPA possivelmente serão elucidadas pelos mecanismos de ação envolvidos na coagulação e caracterização estrutural desses compostos. Portanto, a rodofícea *Halymenia* sp. é uma boa fonte de heparinoides e sugerem-se estudos relacionados ao cultivo da espécie, em proteção aos bancos de algas.

Palavras-chave: alga vermelha, extrações sequenciais, coagulação sanguínea, TTPA.

ABSTRACT. Natural heparinoids isolated from *Halymenia* sp. (Rhodophyceae) delivery on the Ceará coast. The increasing demand for heparin (HEP) has led to a search for alternative sources of natural anticoagulants. This study aimed to evaluate the anticoagulant activity of sulfated polysaccharides (SP) isolated from a *Halymenia* rhodophyceae genus native to the coast of Ceará, Brazil. Total SP were obtained by consecutive digestions with papain in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA, followed by ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose column. The obtained fractions were concentrated by lyophilization and submitted to 0.5% agarose gel electrophoresis. Anticoagulant activity was evaluated by the activated partial thromboplastin time (APTT) using plasma from rabbits and a standard HEP (100 IU mg⁻¹) curve. The extractions (53.96%) showed marked differences during the fractionation and in the degree of purification of SP. The species SP showed higher activity anticoagulant than that of HEP. However, the APTT of the fractions changed sharply among the extractions, expressing itself in a dose-dependent manner and increasing from 110.40 (1st extraction) to 143.10 IU mg⁻¹ (3rd extraction). The results suggest that the anticoagulant activity of SP isolated from *Halymenia* sp. was promoted by inhibition of the intrinsic and/or common pathway of the coagulation cascade. The changes on APTT possibly will be elucidated through the mechanisms of action involved in coagulation and structural characterization of these compounds. Therefore, the red alga *Halymenia* sp. is a good source of heparinoids, and studies are suggested on the cultivation of this species and on the protection of natural algae banks.

Key words: red algae, sequential extractions, blood coagulation, APTT.

Introdução

As algas são organismos fotossintetizantes de grande valor ecológico e que são utilizadas pelo homem há décadas (LEVRING et al., 1969; GREENWELL; LAURENS, 2008; NEORI et al., 1998). A síntese de

compostos conhecidos como polissacarídeos sulfatados (PS) tem despertado grande interesse nas indústrias de alimento (GLICKSMAN, 1983), farmacêutica (ATHUKORALA et al., 2006; FARIAS et al., 2001; FONSECA et al., 2008; PUSHPAMALI et al., 2008) e

outros setores econômicos (ARAÚJO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009a), proporcionando, assim, a obtenção de novos polímeros naturais para biotecnologia.

A incidência das doenças cardiovasculares nos últimos anos tem sido relacionada, principalmente, ao próprio estilo de vida do homem (sedentarismo, estresse e hábitos alimentares), sendo, nos Estados Unidos, duas vezes maior o número de mortes comparadas ao câncer (NADER et al., 2001). Considerada o segundo agente terapêutico natural mais utilizado no mundo, a heparina (HEP) é um PS com potente atividade anticoagulante e antitrombótica rotineiramente empregada em cirurgias cardíacas no mundo. Porém sua utilização também é potencialmente acompanhada por diversos fatores de risco, tais como hemorragia, plaquetopenia, viral etc, mesmo com o uso de HEPs de baixo peso (THOMAS, 1997). Recentemente, Melo et al. (2008) reportaram a baixa qualidade de preparações de HEPs disponíveis no mercado brasileiro, em decorrência da carência da HEP no mercado internacional e seus potenciais riscos de contaminação.

Diversos organismos são fontes naturais de heparinoides, incluindo os invertebrados (MOURÃO; PEREIRA, 1999), as algas marinhas (ATHUKORALA et al., 2006; FONSECA et al., 2008) e os peixes (MANSOUR et al., 2009), e vários aspectos sobre estrutura e metabolismo de polissacarídeos de algas marinhas podem ser encontrados em revisões específicas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). Farias et al. (2000) e Pereira et al. (2005) relataram galactanas sulfatadas obtidas por digestão enzimática das rodofíceas *Botryocladia occidentalis* e *Gelidium crinale* com potentes atividades anticoagulantes. A rodofícea *Champia feldmannii* também possui PS com atividade anticoagulante (ASSREUY et al., 2008), enquanto aquele isolado da alga marinha vermelha *Lomentaria catenata* superou a HEP (PUSHPAMALI et al., 2008).

Algumas atividades biológicas têm sido relatadas para espécies do gênero *Halymenia* (RODRIGUES et al., 2009a; 2009b). Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar algumas características dos PS isolados de uma espécie do gênero (*Halymenia* sp.). O potencial anticoagulante desses compostos também foi avaliado, contribuindo com a bioprospecção de novos anticoagulantes naturais.

Material e métodos

Alga marinha e extração dos PS totais (PST)

Exemplares arribados de *Halymenia* sp. *C. Agardh* (Rhodophyta) foram coletados na praia de Flecheiras-Trairi-Ceará, em julho de 2005, e

conduzidos em sacos plásticos para o Laboratório de Bioquímica Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca/Universidade Federal do Ceará. Em laboratório, as algas foram lavadas com água destilada, desidratadas ao sol, cortadas em pequenos pedaços e armazenadas em frascos para posterior extração dos PS. Posteriormente, os PST foram extraídos com 17 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg mL⁻¹) 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 de tecido. 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 2M: etanol absoluto (100: 15; v v⁻¹). Logo após uma precipitação com etanol absoluto (24h; 4°C), o material foi lavado com etanol 80% (200 mL; 2 ×), etanol absoluto (200 mL; 1 ×) e seco em estufa durante 24h a 60°C (FARIAS et al., 2000). Os resíduos das extrações foram re-digeridos com papaína a fim de se tornar ótimo o rendimento de acordo com Rodrigues et al. (2009b).

Purificação por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose)

Inicialmente, os PST (10 mg) foram dissolvidos em tampão AcNa 0,1 M e submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose equilibrada e percolada com o tampão de extração (AcNa 0,1 M) até a completa remoção dos polissacarídeos não-retidos, seguido do fracionamento dos PS por eluição com o mesmo tampão, contendo NaCl em diferentes concentrações (0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 e 2,00 M), utilizando-se um coletor de frações (FRAC-920) com fluxo ajustado para 60 mL h⁻¹. As frações (5 mL) obtidas foram monitoradas por meio da propriedade metacromática, usando-se o azul de 1,9-dimetilmetileno (ADM) (FARNDALDE et al., 1986) a 525 nm. As frações de PS obtidas foram dialisadas exaustivamente contra água destilada, concentradas por liofilização e armazenadas até a realização dos ensaios.

Deteção de carboidratos totais e eletroforese em gel de agarose

A presença de carboidratos totais (CT) das frações de PS obtidas foi determinada pelo método fenol-ácido sulfúrico segundo Dubois et al. (1956). Os PST e as frações de PS (15 µg) também foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 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 a 0,1% por 24h. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina a 0,1% e descorado com uma solução de etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; $v^{-1} v^{-1} v^{-1}$) (DIETRICH; DIETRICH, 1976).

Ensaios anticoagulantes

Para os testes, sangue de coelho citratado foi obtido de animais mantidos pela Universidade Federal do Ceará e a avaliação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) foi mensurada, segundo Anderson et al. (1976). Inicialmente, o sangue foi centrifugado ($73,75 \times g$; 15 min.) para a obtenção de um plasma pobre em plaquetas. O teste foi realizado, incubando-se a 37°C por 3 min. 50 μ L de cefatina ativada (Celite, Biolab), 50 μ L de plasma de coelho e 10 μ L da solução de PS. Após a incubação, foram adicionados 50 μ L de cloreto de cálcio 25 mM (Celite, Biolab) à mistura para se 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 de polissacarídeo (UI mg^{-1}), utilizando-se um padrão de HEP (100 UI mg^{-1}).

Resultados e discussão

Rendimento

O emprego da metodologia que utiliza a digestão enzimática de proteínas por enzimas proteolíticas (papaína) resultou em três extrações consecutivas de PST (Figura 1). Os rendimentos sofreram decréscimos marcantes no decorrer das extrações de *Halymenia* sp. mas totalizaram 53,96% de rendimento final. No entanto, a maior quantidade de PST foi obtida durante a primeira extração (46,0%). A segunda e a terceira extrações resultaram em apenas 7,36 e 0,6%, respectivamente, a partir da alga desidratada e triturada.

Vários métodos são empregados na obtenção de PST de algas marinhas (ASSREUY et al., 2008; ATHUKORALA et al., 2006; FARIAS et al., 2000; PERCIVAL; McDOWELL, 1967; PEREIRA et al., 2005; PUSHPAMALI et al., 2008) e a utilização de extrações consecutivas tem sido uma técnica eficiente na otimização do rendimento desses compostos. Extrações sucessivas de PST na presença da papaína que utiliza a clorofícea *Caulerpa*

sertularioides por Bezerra-Neto et al. (2008) resultou em rendimentos totais de 7,10 e 8,10%, utilizando, respectivamente, CCP e etanol absoluto como solventes na precipitação de PST. Na extração de PST de outra espécie do gênero (*Halymenia pseudofloresia*), Rodrigues et al. (2009b) obtiveram rendimentos inferiores (40,50; 4,90 e 1,74%, respectivamente) quando comparados a este trabalho (Figura 1). Portanto, a rodofícea *Halymenia* sp. é uma excelente fonte de PS.

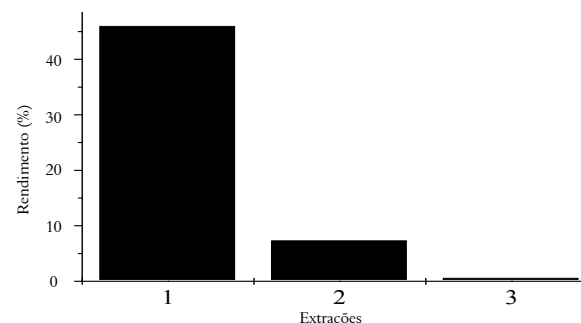


Figura 1. Rendimento, por extração, dos PST da alga marinha vermelha *Halymenia* sp.

Neste trabalho, o decréscimo no rendimento no decorrer das extrações também foi observado em outras espécies (BEZERRA-NETO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009b), o que sugere a eficiência do método na extração de diferentes grupos de PST alocados entre diferentes camadas do tecido algal (PERCIVAL; McDOWELL, 1967) para favorecer a obtenção de novos biopolímeros naturais, tendo em vista que algumas espécies de rodofíceas possuem PS (conhecidos como ficocoloides) de alto valor comercial em razão de suas propriedades espessantes, geleificantes e emulsificantes na indústria de alimentos (GLICKSMAN, 1983).

Vale salientar que a utilização da mesma metodologia empregada neste trabalho também se demonstrou eficiente quando comparada à outra espécie do gênero (RODRIGUES et al., 2009b). Contudo, a biossíntese e composição química desses compostos podem sofrer variação mediante as condições climáticas ambientais. Os fatores de temperatura, luminosidade e a concentração de nutrientes na água variam com a localidade e a estação do ano (PERCIVAL; McDOWELL, 1967).

Purificação por cromatografia de troca iônica DEAE-celulose

Os perfis cromatográficos obtidos em DEAE-celulose (gradiente salino) foram diferentes entre as extrações. Na 1ª extração foram separadas quatro frações eluídas com NaCl 0,50 (F I); 0,75 (F II); 1,00

(F III) e 1,25 M (F IV), das quais a F II apresentou a maior metacromasia em 525 nm (Figura 2A). Este comportamento diferiu em relação à 2ª e à 3ª extrações (Figuras 2B e C), quando foram observadas diferenças no número 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 CT pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) quando também comparadas as obtidas de *H. pseudofloresia* (RODRIGUES et al., 2009b).

Diferenças marcantes entre perfis cromatográficos de PS também foram relatadas utilizando outra espécie do gênero recentemente investigada por Rodrigues et al. (2009b), quando a intensidade metacromática das frações também diferiu entre as extrações, enquanto perfis comparativamente bem semelhantes de PS foram obtidos da clorofícea *C. sertularioides* por Bezerra-Neto et al. (2008), a partir de diferentes extrações de PST. Portanto, tais diferenças nos perfis dos fracionamentos de PS por DEAE-celulose de algas marinhas também seriam características de cada espécie. Estes resultados indicam que a resina de DEAE-celulose foi eficiente na separação de frações de PS extraídos da rodofícea *Halymenia* sp.

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 os PST e as frações de PS obtidas de uma única extração (Figura 3). As frações F I; F II e F III (1ª extração) apresentaram padrão de cargas semelhantes entre si, porém com baixa purificação (Figura 3A). Por sua vez, a F IV (dado não-apresentado) não foi observada no gel, sugerindo-se menor presença de grupos

sulfato. Por outro lado, quando as frações obtidas na 3ª extração foram submetidas à eletroforese (Figura 3B), observou-se maior resolução bem como mobilidades semelhantes à HEP.

Rodrigues et al. (2009b) também obtiveram resultados semelhantes durante a purificação de PS da rodofícea do mesmo gênero (*H. pseudofloresia*). Os autores observaram que o grau de definição aumentou ao longo do processo, uma vez que essas macromoléculas apresentavam uma estrutura química bastante complexa e heterogênea (FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; PUSHPAMALI et al., 2008). Assim como foi observado anteriormente, a coluna de troca iônica DEAE-celulose foi eficiente na purificação das frações de PS de *Halymenia* sp. (Figuras 2 e 3). Por outro lado, o perfil eletroforético observado na 3ª extração (Figura 3B) foi diferente daquele obtido na 3ª extração de *H. pseudofloresia* (RODRIGUES et al., 2009b), quando, nesta última, a presença nos PST de duas bandas distintas entre si pela densidade de cargas no gel resultou em um padrão eletroforético distinto tanto entre os PST e as respectivas frações, bem como entre os PST e as demais extrações da espécie. Tais características se traduzem na complexidade e heterogeneidade desses compostos quando obtidos de diferentes espécies e, acredita-se que o maior grau de purificação desses PS obtidos se traduza numa vantagem na caracterização desses compostos (RODRIGUES et al., 2009b), tendo em vista a grande dificuldade na elucidação de suas estruturas químicas (FARIAS et al., 2000; PERCIVAL; McDOWELL, 1967; PEREIRA et al., 2005) e suas relações com as atividades biológicas (FONSECA et al., 2008; MOURÃO; PEREIRA, 1999).

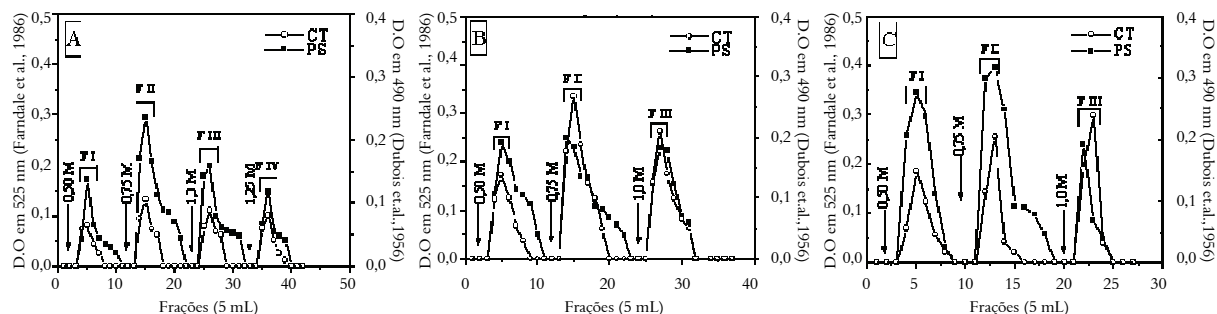


Figura 2. Cromatogramas dos PST obtidos na 1ª (A); 2ª (B) e na 3ª (C) extrações de *Halymenia* sp. em coluna de troca iônica (DEAE-celulose). A coluna foi equilibrada e lavada com tampão AcNa 0,10 M. Os PS adsorvidos no gel foram eluídos com o tampão de AcNa 0,10 M, contendo NaCl em diferentes concentrações (0,50; 0,75; 1,00; 1,25 e 1,50 M). Os PS foram monitorados pela propriedade metacromática com azul-dimetilmetileno (525 nm). (○—○) carboidratos totais (CT); (■—■) polissacarídeos sulfatados (PS) e (NaCl) gradiente salino.

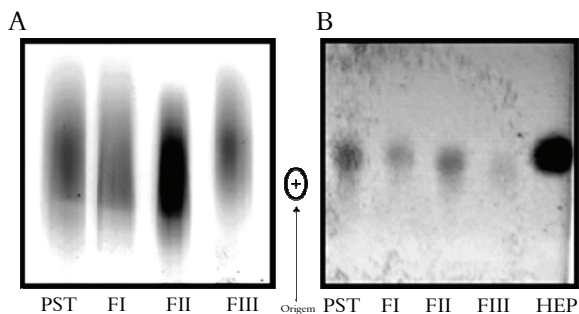


Figura 3. Revelação das frações de PS obtidas na 1ª (A) e na 3ª (B) extrações da alga marinha vermelha *Halymenia* sp por eletroforese em gel de agarose a 0,5% e quando comparadas à HEP não-fractionada (B). Os PST, frações (F I; F II; F III e F IV) e HEP presentes no gel foram corados com azul de toluidina a 0,1%.

Atividade anticoagulante

O teste do TTPA é um dos mais usados na mensuração de PS com atividade anticoagulante, indicando com precisão o potencial anticoagulante do composto isolado (MOURÃO; PEREIRA, 1999). Assim, a espécie apresentou frações com atividade anticoagulante. A fração F II, eluída com 0,75 M de NaCl, foi a mais ativa na 1ª extração, seguida das frações F IV; F III e F I (1,25; 1,00 e 0,50 M de NaCl), cujas atividades foram 110,40; 98,80; 79,60 e 54,10 UI mg^{-1} , respectivamente (Figura 4A). Contudo, a atividade sofreu um acréscimo na 3ª extração (Figura 4B), prolongando em 2,77 vezes (143,10 UI mg^{-1}) o TTPA do plasma de coelho (26,70 s). A fração F I (0,50 M de NaCl), a uma elevada concentração de PS (1,0 mg mL^{-1}), também não foi praticamente capaz de alterar o TTPA normal. Desta forma, a atividade observada em frações isoladas de *Halymenia* sp. superou o padrão de HEP utilizado (100 UI mg^{-1}). Geralmente, um prolongamento no TTPA sugere inibição da via intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação (PUSHPAMALI et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009b; RODRIGUES et al., 2010).

Este trabalho também sugere que é possível se obter PS com diferentes atividades anticoagulantes (TTPA), utilizando-se extrações consecutivas do mesmo material. Farias et al. (2000) sugerem que a adição de ésteres sulfato a uma única unidade de α -galactana do polissacarídeo isolado da rodofíceia *B. occidentalis* tem efeito amplificador na atividade anticoagulante, o qual exerce mecanismo potencializador na inibição da atividade da trombina mediante a antitrombina e o cofator II da HEP (reguladores plasmáticos da coagulação sanguínea). A galactana de *B. occidentalis* também apresentou potente atividade antitrombótica, quando o composto exerceu, a uma dose de 0,20 mg kg^{-1} , efeito máximo pelo modelo intravenoso em ratos (FARIAS et al., 2001). Os autores ainda observaram

que o polissacarídeo não alterou a coagulação para exibir um efeito antitrombótico.

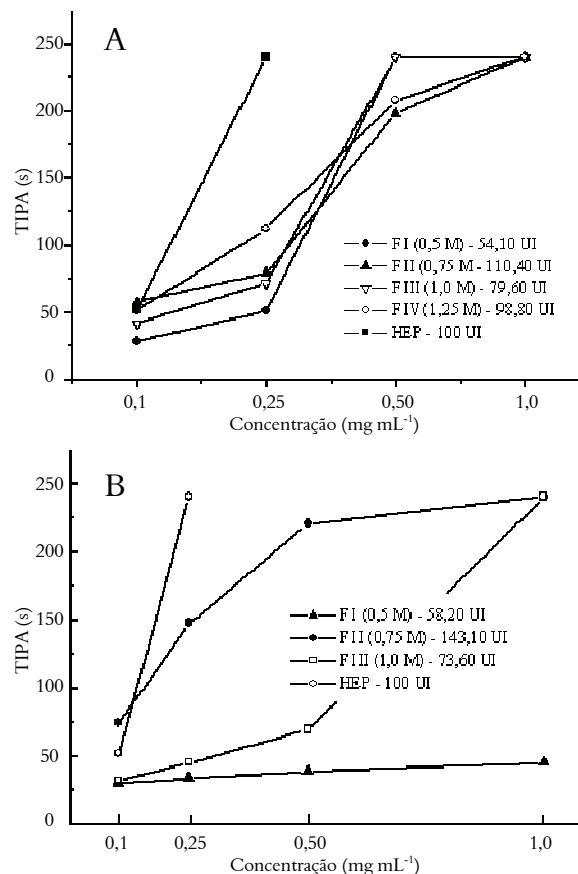


Figura 4. Curvas de atividade anticoagulante das frações de PS obtidas na 1ª (A) e na 3ª (B) extrações de *Halymenia* sp. em coluna de troca iônica (DEAE-celulose) em relação à HEP. (TTPA = 240 s) tempo-limite de detecção; (TTPA = 26, 70 s) tempo-controle do plasma de coelho.

Recentemente, Rodrigues et al. (2009b) reportaram acentuada atividade anticoagulante de frações de PS isoladas da rodofíceia *H. pseudofloresia*, utilizando plasma de coelho citratado. Os autores também observaram que o TTPA modificou-se entre as diferentes extrações de PST realizadas para a espécie, cujas atividades das frações obtidas na primeira extração (464,20; 211,60; 103,50 e 101,70 UI mg^{-1}) foram superiores quando comparadas àquelas da terceira (137,10; 96,50 e 89,20 UI mg^{-1}) extração, respectivamente, sendo, portanto, superiores ao padrão de HEP utilizado (100 UI mg^{-1}) e a espécie utilizada neste trabalho (Figura 4). Quando esses polissacarídeos, obtidos da extração de PST de maior rendimento, foram utilizados em bioensaios na água de cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*, foi observado que o composto também proporcionou melhora na taxa de sobrevivência, qualidade no ganho de peso e consumo alimentar

dos animais durante o período de aplicação do PS, sugerindo uma ação imunoestimulante (RODRIGUES et al. 2009a) e demonstrando sua utilização em outros processos biotecnológicos. Segundo Bricknell e Dalmo (2005), o uso de imunoestimulantes na aquicultura é recomendado quando o risco de doenças é mais elevado, para melhorar o estado de saúde dos organismos aquáticos, quando os animais são expostos à situação de estresse.

Neste trabalho, o efeito dos PS de *Halymenia* sp. na coagulação foi 2,77 vezes mais potente que o padrão de HEP utilizado (Figura 4B). Curiosamente, a maior atividade foi observada na 3ª extração na qual o rendimento de PST foi minoritário (Figura 1), bem como dependente do acréscimo da propriedade metacromática no decorrer das diferentes extrações (Figuras 2 e 4). Porém, tal fato foi diferente daquele reportado para os PS isolados de *H. pseudofloresia* (RODRIGUES et al., 2009b), quando não foi observada relação entre metacromasia e atividade. Os TTPs também foram amplificados pelo aumento da concentração de PS (dose-dependente) (Figura 4), sugerindo-se a realização de outros modelos biológicos. Segundo Mourão e Pereira (1999) o estudo desses compostos não bastam 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. Modelos de experimentação animal representam ferramentas importantes para se avaliar os efeitos de diferentes polissacarídeos no desenvolvimento de novas drogas e para também melhor conhecer a fisiopatologia das doenças tromboembólicas.

Fonseca et al. (2008) reportaram um estudo comparativo entre duas galactanas sulfatadas isoladas das rodofíceas *B. occidentalis* e *Gelidium crinale*, envolvendo relações entre suas diferenças nas proporções e/ou distribuição dos radicais sulfato na estrutura química com seus mecanismos distintos de interação com proteases, inibidores e ativadores do sistema de coagulação para elucidar suas relações nas atividades anti- e pró-coagulantes, além da ação anti- e pró-trombótica desses compostos. Essas galactanas já haviam sido descritas por Farias et al. (2000) e Pereira et al. (2005) como agentes anticoagulantes (150 e 65 UI mg⁻¹ para *B. occidentalis* e *G. crinale*, respectivamente).

Desta forma, as alterações na atividade entre as extrações poderão ser melhor compreendidas pela elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na coagulação e pela caracterização estrutural desses

polímeros. O estudo das características químicas e estruturais dessas macromoléculas torna-se de grande importância para se elucidar o efeito do composto na coagulação (FARIAS et al., 2000; FONSECA et al., 2008; MOURÃO; PEREIRA, 1999; PEREIRA et al., 2005). Portanto, as diferenças no grau de resolução desses polissacarídeos (Figura 3) podem ser resultado de mudanças dos padrões químicos nas estruturas dessas moléculas (RODRIGUES et al., 2009a). A investigação desta hipótese poderá ajudar na melhor compreensão do mecanismo relacionado entre as funções biológicas e as estruturas desses compostos (BEZERRA-NETO et al., 2008; FONSECA et al., 2008; MOURÃO; PEREIRA, 1999; RODRIGUES et al., 2009b).

Por outro lado, estudos relacionados ao cultivo desses organismos também são fundamentais como forma sustentável de utilização, em proteção aos bancos naturais de algas, já que exemplares arribados da espécie também participam do processo natural de fertilização costeira, promovendo o equilíbrio ambiental.

Conclusão

Polissacarídeos sulfatados extraídos sequencialmente mediante a digestão proteolítica (papaína) da alga marinha vermelha *Halymenia* sp. apresentaram atividade anticoagulante. No entanto, tal atividade modificou-se acentuadamente entre as extrações, possivelmente em razão da mudança da conformação estrutural dessas macromoléculas. Acredita-se que, por meio do estudo dos mecanismos de ação envolvidos na coagulação, será possível esclarecer tal fato.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes.

Referências

- ANDERSON, 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**, v. 9, n. 6, p. 575-583, 1976.
- ARAÚJO, G. S.; FARIAS, W. R. L.; RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; PONTES, G. C. Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 4, p. 548-554, 2008.
- ASSREUY, A. M. S.; GOMES, D. M.; SILVA, M. S. J.; TORRES, V. M.; SIQUEIRA, R. C. L.; PIRES, A. F.; CRIDDLE, D. N.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Biological effects

- of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red alga *Champia feldmannii*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 691-695, 2008.
- ATHUKORALA, Y.; JUNG, W. K.; VASANTHAN, T.; JEON, Y. J. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 184-191, 2006.
- BEZERRA-NETO, J. T. B.; RODRIGUES, J. A. G.; PONTES, G. C.; FARIAS, W. R. L. Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) HOWE: análise de metodologias de precipitação. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 3, n. 2, p. 50-62, 2008.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R. A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 19, n. 5, p. 457-472, 2005.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- FARIAS, W. R. L.; 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**, v. 86, n. 6, p. 1540-1546, 2001.
- FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.
- FARNDAL, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimistry et Biophysica Acta**, v. 883, n. 2, p. 173-177, 1986.
- FONSECA, R. J. C.; OLIVEIRA, S. N. M. C. G.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MOURÃO, P. A. S. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 3, p. 539-545, 2008.
- GLICKSMAN, M. **Food hydrocolloids**: natural plant exudates – seaweed extracts. Baton Raton: CRC Press, 1983.
- GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L. Biocombustível: microalgas podem ser a solução? **Panorama da Aquicultura**, v. 28, n. 106, p. 40-45, 2008.
- LEVRING, T.; HOPPE, H. A.; SCHMID, O. J. **Marine algae**: a survey of research and utilization. New York: Academic Press, 1969. (Botanical marine handbook, v. 1).
- MANSOUR, M. B.; MAJDOUB, H.; BATAILLE, I.; ROUDESLI, M. S.; HASSINE, M.; AJZENBERG, N.; CHAUBET, F.; MAAROUFI, R. M. Polysaccharides from the skin of the ray *Raja radula*. Partial characterization and anticoagulant activity. **Thrombosis Research**, v. 123, n. 4, p. 671-678, 2009.
- MELO, E. I.; PEREIRA, M. S.; CUNHA, R. S.; SÁ, M. P. L.; MOURÃO, P. A. S. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 23, n. 2, p. 169-174, 2008.
- MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends on Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 225-232, 1999.
- NADER, H. B.; PINHAL, M. A. S.; BAÚ, E. C.; CASTRO, R. A. B.; MEDEIROS, G. F.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L. TRINDADE, E. S.; SHINJO, S. K.; ROCHA, H. A. O.; TERSARIOL, E. S.; MENDES, A.; DIETRICH, C. P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 6, p. 699-709, 2001.
- NEORI, A.; RAGG, N. L. C.; SHPIGEL, M. The integrate culture of seaweed, abalone, fish and clams in modular intensive land-based systems: II. Performance and nitrogen partitioning within an abalone (*Halotis tuberculata*) and macroalgae culture system. **Aquacultural Engineering**, v. 17, n. 4, p. 275-239, 1998.
- PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MELO, M. R. S.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 12, p. 2015-2023, 2005.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. New York: Academic Press, 1967.
- PUSHPAMALI, W. A.; NIKAPITIYA, C.; ZOYSA, M. D.; WHANG, I.; KIM, S. J.; LEE, J. Isolation and purification of an anticoagulant from fermented red seaweed *Lomentaria catenata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 2, p. 274-279, 2008.
- RODRIGUES, J. A. G.; JÚNIOR, J. S.; LOURENÇO, J. A.; LIMA, P. C. W. C.; FARIAS, W. R. L. Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Halymenia pseudofloresia* mediante uma estratégia profilática. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 1, p. 71-78, 2009a.
- RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 2, p. 224-231, 2009b.
- RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; BENEVIDES, N. M. B. Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração,

fracionamento e atividade anticoagulante. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 2, p. 113-120, 2010.

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

Received on February 4, 2009.

Accepted on April 13, 2009.

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