

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE MACROALGAS MARINHAS\*

José Ariévilto Gurgel RODRIGUES<sup>1,2,\*\*</sup>, Edfranck de Sousa Oliveira VANDERLEI<sup>2</sup>, Ana Luíza Gomes QUINDERÉ<sup>2</sup>, Chistiane Oliveira COURA<sup>2</sup>, Norma Maria Barros BENEVIDES<sup>1,2,\*\*</sup>

<sup>1</sup> Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará - UECE

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará - UFC

\*\*e-mails: arieviltoengpesca@yahoo.com.br, nmdbb@ufc.br

Recebido em: 1 de maio de 2009

**Resumo** - A biodiversidade marinha brasileira favorece a descoberta de novos polissacarídeos sulfatados (PS) com atividade anticoagulante em substituição a heparina (HEP) na clínica médica. Neste trabalho objetivou-se fracionar e avaliar a atividade anticoagulante de PS isolados de seis espécies de macroalgas marinhas (Chlorophyta e Rhodophyta) nativas do litoral do Estado do Ceará. Inicialmente, as algas foram digeridas com papaína bruta em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM para obtenção dos PS totais (PST), seguido por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose utilizando um gradiente de NaCl. A atividade anticoagulante foi avaliada através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) usando plasma humano normal e HEP padrão (193 UI mg<sup>-1</sup>). Verificou-se que o rendimento e o perfil cromatográfico foram diferentes entre as espécies estudadas, sendo as rodofíceas fontes ricas em PST. O teste do TTPA revelou frações de PS com atividade anticoagulante somente nas espécies *Caulerpa racemosa* e *Solieria filiformis*, cujas atividades foram de apenas 17,09 e 2,31 UI mg<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto PS isolados de *Gracilaria birdiae*, *G. cornea*, *Pterocladia capillacea* e *Ulva fasciata* não modificaram o TTPA normal. Portanto, a maioria das macroalgas marinhas utilizadas possuem PS incapazes de agir na via intrínseca e/ou comum do sistema de coagulação sanguínea.

Palavras-chave: algas marinhas, macromoléculas sulfatadas, coagulação sanguínea, teste do TTPA.

### POTENTIAL ANTICOAGULANT EVALUATION OF SULFATED POLYSACCHARIDES FROM MARINE MACROALGAE

**Abstract** - The Brazilian marine diversity stimulus to discovery of new sulfated polysaccharides (SP) with anticoagulant activity to substitution to heparin (HEP) in clinical medic. It was objected to fractionation and evaluates the anticoagulant activity of SP isolated from six native marine macroalgae species (Chlorophyta and Rhodophyta) from the coast of Ceará State, Brazil. Initially, the algae were submitted to digestions with crude papain in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA to obtaining the total SP (TSP), followed by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose column using a NaCl gradient. The anticoagulant activity was evaluated by the activated partial thromboplastine time (APTT) using normal human plasma and standard HEP (193 IU mg<sup>-1</sup>). It was found that the yield and chromatographic profile were different among the species, being rich sources of TSP in Rhodophyceas. The APTT test showed SP fractions with anticoagulant activity only in *Caulerpa racemosa* and *Solieria filiformis* species, whose activities were 17.09 and 2.31 IU mg<sup>-1</sup>, respectively, whereas SP isolated from *Gracilaria birdiae*, *G. cornea*, *Pterocladia capillacea* and *Ulva fasciata* no modified the normal APTT. In general, SP isolated from studied marine macroalgae no act on the intrinsic and/or pathways of the blood coagulation system.

Key-words: marine algae, sulfated macromolecules, blood coagulation, APTT test.

\*Pesquisa desenvolvida com apoio financeiro da RENORBIO/CNPq/FUNCAP/CAPES/MCT/MS.

## INTRODUÇÃO

Produtos do metabolismo primário (ácidos nucleicos, polissacarídeos e proteínas) e secundário (alcalóides, terpenóides etc) oriundos de bactérias, fungos, algas, invertebrados e vertebrados marinhos têm sido reportados diversas atividades biológicas de interesse farmacológico. O isolamento de muitos desses compostos também têm sido relacionados para caracterização taxonômica de grupos, por exemplo, envolvendo filogenia e biogeografia de algas, levando a implicações evolucionárias das interações biológicas nos sistemas marinhos, tendo em vista as limitações existentes em cada grupo taxonômico. A elucidação estrutural dos produtos naturais marinhos gera perspectivas quanto a uma melhor compreensão dos mecanismos biossintéticos existentes entre os seres vivos, relacionando o papel ecológico e evolutivo desses metabólitos como ferramentas importantes de forma inferir implicações como marcadores taxonômicos, filogenéticos e biogeográficos (Teixeira, 2002).

Os polissacarídeos sulfatados (PS) de algas marinhas são polímeros complexos e heterogêneos de origem não mamária encontrados em grandes concentrações nesses organismos (Percival & McDowell, 1967, Rodrigues *et al.*, 2009a), os quais estão naturalmente alocados na matriz extracelular (Painter, 1983). Esses açúcares sulfatados sugerem estar envolvidos nas funções iônica, mecânica e osmótica, favorecendo a sobrevivência das algas no ambiente marinho (Kloareg & Quatrano, 1998), podendo sua biossíntese ser afetada por fatores ambientais, época do ano, profundidade e a localidade, onde esses organismos são encontrados (Percival & McDowell, 1967, Bird, 1988). Vários aspectos sobre a estrutura e metabolismo dos polissacarídeos de algas marinhas são descritos em revisões específicas (Percival, McDowell, 1967, Painter, 1983, Campo *et al.*, 2009).

Os PS não estão presentes apenas nas macroalgas marinhas, mas também em microalgas (Hayashi, Hayashi & Kojima, 1996), invertebrados (Mourão & Pereira, 1999) e gramíneas marinhas, como relatado por Aquino *et al.* (2005). Nas algas marinhas, os PS podem estar na forma de galactanas sulfatas nas algas vermelhas (Rhodophyta), de fucanas nas algas pardas ou marrons (Phaeophyta) e, nas verdes, os mais encontrados são as arabino-galactanas (Chlorophyta) (Percival & McDowell, 1967), enquanto nos vertebrados ocorrem na forma de glicosaminoglicanos (Kjellén & Lindahl, 1991).

Nas algas marinhas, a presença de radicais sulfatos e suas posições na estrutura química tem sido pré-requisitos dessas macromoléculas exibirem importantes atividades biológicas de interesse em Biomedicina (Nishiro, Aizu & Nagumo, 1991, Farias *et al.*, 2000, Van de Velde, Pereira & Rollema, 2004, Amorim, 2005), incluindo, principalmente, suas ações anticoagulante e antitrombótica (Farias *et al.*, 2000, Farias *et al.*, 2001, Fonseca *et al.*, 2008, Rodrigues *et al.*, 2009a). Por exemplo, um PS isolado com atividade anticoagulante, Matsubara *et al.* (2001) relataram de algas marinhas verdes do

gênero *Codium* com mecanismo de ação diferente daquele reportado para a HEP. Galactanas sulfatadas isoladas das algas marinhas vermelhas *Botryocladia occidentalis* e *Gelidium crinale* apresentaram potentes atividades anticoagulantes (Farias *et al.*, 2000, Pereira *et al.*, 2005). Polissacarídeos anticoagulantes também foram descritos por Pushpamali *et al.* (2008) e Zhang *et al.* (2008) para as espécies *Lomentaria catenata* (Rhodophyta) e *Monostroma latissimum* (Chlorophyta), respectivamente. Recentemente, Fonseca *et al.* (2008) mostraram efeitos biológicos distintos de PS dependentes de suas variações estruturais, resultando em interações particulares entre proteases e inibidores da cascata de coagulação. Tais variações estruturais produziram ações anti- e pró-coagulante, bem como anti- e pró-trombótica. Esses estudos foram realizados com os PS isoladas das rodofíceas *B. occidentalis* e *G. crinale*, utilizando modelos experimentais de trombose em ratos.

Outras atividades biológicas dos PS, no entanto, são descritas na literatura. Por exemplo, um heteropolissacarídeo altamente sulfatado (conhecido como “ulvan”) extraído da alga marinha verde *Ulva pertusa* exibiu uma potente ação antioxidante *in vitro* (Qi *et al.*, 2005). Talarico *et al.* (2005) reportaram que os PS obtidos das algas marinhas vermelhas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata* mostraram propriedades antivirais contra quatro serotipos do vírus da dengue em tipos diferentes de células. Efeitos biológicos diferentes (anticoagulante, antinociceptivo e pró-inflamatório) foram relatados por Assreuy *et al.* (2008) de um PS isolado da alga marinha vermelha *Champia feldmannii*. Alguns relatos também têm sido descritos sobre o emprego de PS na prevenção do estresse e/ou no controle de infecções em bioensaios utilizando organismos aquáticos, quando administrados por diferentes vias (Rodrigues *et al.*, 2009b), despertando assim um grande interesse em várias aplicações biotecnológicas.

Tendo em vista o aumento do número de doenças cardiovasculares no mundo e aos riscos associados da heparinoterapia (Thomas, 1997), estudos que objetivem a identificação de novos compostos anticoagulantes são importantes. De forma a contribuir com a descoberta de novos agentes anticoagulantes, diferentes espécies de algas marinhas nativas do litoral cearense foram investigadas pelo emprego de técnicas de bioquímica comparativa, contribuindo também para a caracterização desses compostos isolados de algas oriundas de diferentes filos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### COLETA DAS ALGAS E EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS TOTAIS (PST)

Exemplares de seis espécies de macroalgas marinhas foram coletados de bancos naturais cearenses das praias de Flecheiras e Pacheco, sendo a pesquisa desenvolvida no laboratório de

Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. Em laboratório, as algas foram limpas para a retirada de epífitas e/ou organismos incrustantes, lavadas com água destilada e armazenadas em frascos fechados para posterior extração dos PST.

A extração dos PST foi realizada segundo Farias *et al.* (2000), com algumas modificações. Inicialmente, a alga desidratada em temperatura ambiente (25 °C) e macerada com N<sub>2</sub> líquido (5 g) foi hidratada em 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (AcNa) (pH 5,0) (Vetec Química) contendo EDTA 5 mM (QEEL) e cisteína 5 mM (Sigma Chemical). Em seguida, foram adicionados 17 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg mL<sup>-1</sup>) para extração dos PST em banho-maria (MARCONI, modelo MA 159) durante 6 horas a 60 °C. Após esse período, o material foi filtrado, centrifugado (2295 × g, 30 min, 15 °C) e, ao sobrenadante, adicionados 16 mL de cloreto cetilpiridínio (CCP) (Sigma Chemical) a 10% para precipitação dos polissacarídeos presentes na mistura por 24 horas a 25 °C. Logo após a precipitação, o extrato foi novamente centrifugado, lavado (200 mL, CCP 0,05%), dissolvido em 174 mL de NaCl 2 M: etanol comercial (100:15, v/v) e novamente precipitado através da adição de 200 mL de etanol comercial (Santa Cruz) (24 h, 4 °C). Logo após a segunda precipitação, o material foi lavado duas vezes com 200 mL de etanol comercial a 80% e uma terceira com etanol comercial (200 mL), quando finalmente foi dialisado e liofilizado para a obtenção dos PST.

#### CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

O extrato total (15 mg) foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose (12 × 1,5 cm) (Sigma Chemical) percolada como tampão AcNa 0,05 M até a completa remoção dos polissacarídeos não retidos, seguido do fracionamento dos PS por eluição com o mesmo tampão de equilíbrio contendo concentrações diferentes de NaCl (0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50 M). As frações obtidas foram monitoradas através da propriedade metacromática usando o azul 1,9-dimetilmetileno (ADM) (Sigma-Aldrich) segundo Farndale *et al.* (1986) em espectrofotômetro ajustado a 525 nm (AMERSHAM BIOSCIENCES ULTROSPEC 1100). Em seguida, as frações metacromáticas foram dializadas e concentradas por liofilização.

#### ENSAIOS ANTICOAGULANTES

A avaliação da atividade anticoagulante (*in vitro*) foi realizada através do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), segundo especificações do fabricante. Inicialmente, o sangue de humano normal citratado (diferentes doadores) foi centrifugado (73,75 × g, 15 min) para a obtenção de um plasma pobre em plaquetas. Para a realização do teste, 50 µL de plasma humano foram

incubados a 37 °C por 3 min com 10 µL da solução de PS e 50 µL do reagente TTPA (CLOT, Bios diagnóstica). Após a incubação, foram adicionados 50 µL de cloreto de cálcio 25 mM (CLOT, Bios diagnóstica) à mistura para ativar a cascata de coagulação. Os ensaios foram realizados em duplicata, sendo o tempo de coagulação registrado automaticamente em um coagulômetro (DRAKE, modelo QUICK-TIMER) e a atividade anticoagulante expressa em unidades internacionais por mg de polissacarídeo utilizando a HEP padrão (193 UI mg<sup>-1</sup>).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma grande variedade de espécies de algas marinhas é encontrada no Estado do Ceará, dentre verdes (77 espécies), pardas (31 espécies) e vermelhas, estas últimas com grande número e preponderância de espécies (205 espécies), perfazendo um total de 313 espécies (FARIAS, 2004). A diversidade biológica favorece a descoberta de novos agentes farmacológicos, como já reportado (Chargaff, Bancroft & Stanley-Brown, 1936, Leite *et al.*, 1998, Farias *et al.*, 2000, Farias *et al.*, 2001, Matsubara *et al.*, 2001, Ghosh *et al.*, 2004, Amorim, 2005, Qi *et al.*, 2005, Athukorala *et al.*, 2006, Athukorala *et al.*, 2007, Assreuy *et al.*, 2008, Bezerra-Neto *et al.*, 2008, Fonseca *et al.*, 2008, Pushpamali *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2008, Campo *et al.*, 2009, Rodrigues *et al.*, 2009a).

### RENDIMENTO

A tabela 1 representa o rendimento de PST por espécie. O emprego da metodologia utilizando a digestão enzimática de proteínas por enzimas proteolíticas (papaína) na extração e de CCP na etapa da precipitação, seguida de secagem por liofilização resultou em rendimentos de PST diferentes entre as espécies estudadas. A maior quantidade de PST foi obtida nas rodofíceas (*G. birdiae*), enquanto as clorofíceas resultaram em, no máximo, em apenas 4,00% (*C. racemosa*). O rendimento de PST da alga marinha vermelha *A. multifida* não foi mensurado devido à escassez de material para estudo.

Como é possível constatar, o rendimento de PST pode variar entre diferentes espécies. A utilização da papaína na extração de PST da alga marinha vermelha *Champia feldmannii*, Assreuy et al. (2008) obtiveram um rendimento de 36,20%, enquanto uma quantidade superior da espécie *H. pseudofloresia* (40,17%) foi obtida por Rodrigues *et al.* (2009a), após secos em estufa (60 °C, 24 h), e quando comparados a este trabalho (Tabela 1). Segundo Bezerra-Neto *et al.* (2008), baixas quantidades de PST foram obtidas da alga marinha verde *C. sertularoides*, quando diferentes solventes foram utilizados na precipitação dos PST extraídos com papaína. Neste trabalho, o rendimento das espécies vermelhas (Tabela 1) foram superiores, por exemplo, daqueles obtidos de *B. occidentalis* (4,00%) (Farias *et al.*, 2000) e *Gelidium crinale* (2,60%) (Pereira *et al.*, 2005), denotando o potencial das

rodofíceas utilizadas como boas fontes de PST. Desta forma, a realização de extrações sequenciais, de forma a tornar ótimo o rendimento desses compostos, sugere estudos posteriores para diferentes aplicações em Biotecnologia (Assreuy *et al.*, 2008, Bezerra-Neto *et al.*, 2008, Campo *et al.*, 2009, Rodrigues *et al.*, 2009a, Rodrigues *et al.*, 2009b).

**Tabela 1.** Rendimento (%) dos PST extraídos das algas marinhas coletadas no litoral cearense

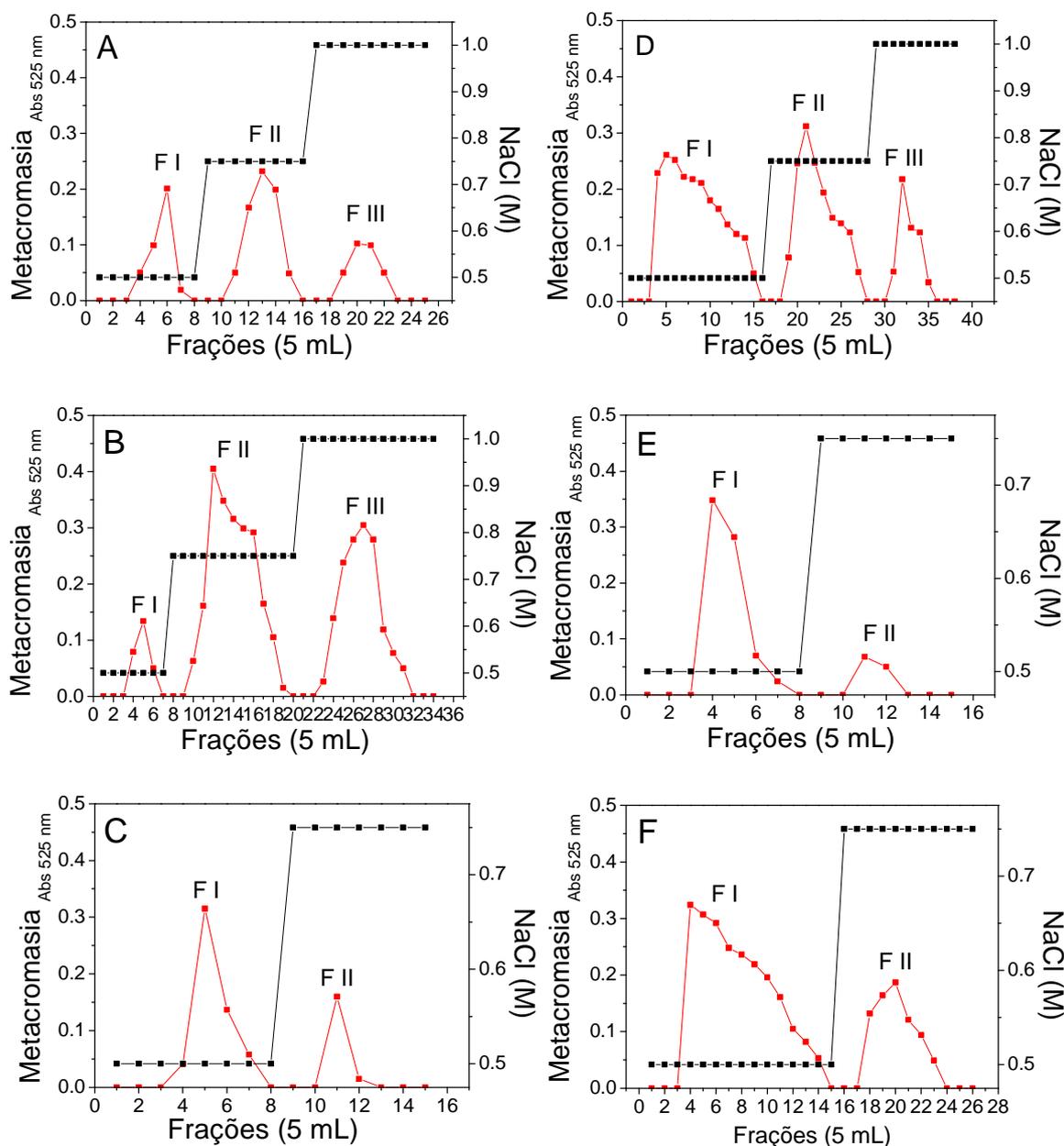
Espécies	Região de coleta	%
<b>Clorofíceas</b>		
<i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskal) J. Agardh	Praia do Pacheco	4,00
<i>Ulva fasciata</i> Delile	Praia do Pacheco	2,97
<b>Rodofíceas</b>		
<i>Amansia multifida</i> J. V. Lamouroux	Praia do Pacheco	NM
<i>Gracilaria birdiae</i> Palastino & Oliveira	Praia de Flecheiras	24,90
<i>Gracilaria cornea</i> J. Agardh	Praia de Flecheiras	18,08
<i>Pterocladia capillacea</i> (S.G. Gmelin) Santelices & Hommersand	Praia do Pacheco	17,89
<i>Solieria filiformis</i> (Kützinger) P.W. Gabrielson	Praia do Pacheco	16,45

NM: não mensurado.

#### FRACIONAMENTO DOS PST EM COLUNA DE TROCA IÔNICA (DEAE-CELULOSE)

O fracionamento dos PST indicou, no geral, perfis cromatográficos diferentes entre as espécies utilizadas (Figura 1). A separação de duas diferentes frações de PS (F I e F II), eluídas nas concentrações de 0,50 e 0,75 M de NaCl, respectivamente, com F I apresentando a maior metacromasia, foram características das espécies *G. birdiae*, *P. capillacea* e *S. filiformis* (Figuras 1C, E e F), enquanto três diferentes frações metacromáticas foram obtidas para as clorofíceas *C. racemosa* e *U. fasciata* (Figuras 1A e B), e a rodofíceia *G. cornea* (Figuras 1D).

Desta forma, a avaliação dos perfis cromatográficos resultou em diferenças quanto em intensidade e número de frações metacromáticas obtidas entre as espécies, o que denota a eficiência da coluna de DEAE-celulose na separação desses compostos. Portanto, a ocorrência desses polímeros, em frações de PS, varia de espécie para espécie. O emprego de procedimentos cromatográficos utilizando a matriz trocadora aniônica DEAE-celulose também tem sido eficiente na separação de frações de PS em várias espécies de algas marinhas (Percival & McDowell, 1967, Pereira *et al.*, 2005, Athukorala *et al.*, 2006, Assreuy *et al.*, 2008, Bezerra-Neto *et al.*, 2008, Rodrigues *et al.*, 2009a). Em adição, as características dessas moléculas, quando também obtidas por extrações sequenciais de PST, podem variar dentro de uma mesma espécie (Rodrigues *et al.*, 2009a).



**Figura 1.** Cromatogramas em DEAE-celulose dos PST isolados das algas marinhas *Caulerpa racemosa* (A), *Ulva fasciata* (B), *Gracilaria birdiae* (C), *G. cornea* (D), *Pterocladia capillacea* (E) e *Solieria filiformis* (F). A coluna foi equilibrada e lavada com tampão AcNa 0,05 M. Os PS adsorvidos no gel foram eluídos com o tampão de AcNa 0,05 M contendo NaCl em diferentes concentrações (0,50, 0,75 e 1,00 M). Os PS foram monitorados com azul dimetilmetileno a 525 nm. (■—■) metacromasia (PS), (■—■) concentração de NaCl (M).

A eficiência na separação por gradiente salino (NaCl) dos PS isolados das algas e adsorvidos no gel de DEAE-celulose (Figura 1) se traduz em vantagens, tendo em vista a complexidade e heterogeneidade desses compostos entre as diferentes espécies de algas existentes. Tais dificuldades

decorem do fato das galactanas sulfatadas (rodofíceas) serem formadas por polímeros de açúcares constituídos de unidades alternadas de  $\beta(1\rightarrow4)$  D-galactopiranosose e  $\alpha(1\rightarrow3)$  galactopiranosose. A complexidade também se justifica pela presença de diferentes proporções de  $\alpha$ -D- ou L-galactopiranosose, de grupamentos sulfatos nas posições 2,4 ou 6 dos resíduos de  $\alpha$ -galactopiranosose ou nas posições 2 e/ou 6 dos resíduos de  $\alpha$ -galactopiranosose e da formação de uma ligação 3,6-anidrogactose, decorrente da eliminação do sulfato da posição 6 dos resíduos de  $\alpha$ -galactopiranosose. As fucanas (feofíceas), por sua vez, é um outro PS abundante em algas, constituído principalmente de  $\alpha$ -L-fucopiranosose, unidas por ligações glicosídicas tipo 1 $\rightarrow$ 2 e com sulfato na posição 4. Outros açúcares se fazem presentes em algas (galactose, xilose, raminose, manose e ácido hexurônico) também descritos em revisões específicas, contribuindo assim em dificuldades nos estudos de caracterização estrutural desses compostos (Percival & McDowell, 1967, Painter, 1983).

#### ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

O teste do TTPA não detectou a ocorrência da atividade anticoagulante na maioria das espécies utilizadas (Tabela 2). Somente as frações polissacarídicas, obtidas por DEAE-celulose, das espécies *C. racermosa* (Chlorophyta) e *S. filiformis* (Rhodophyta) foram capazes de alterar o TTPA normal. No entanto, as atividades registradas foram, respectivamente, da ordem de apenas 17,09 (F II) e 2,31 (F I) UI mg<sup>-1</sup> para *C. racermosa* e *S. filiformis*, sugerindo, portanto, que essas frações de PS promoveram naturalmente a inibição da via intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação sanguínea (Athukorala *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2008, Rodrigues *et al.*, 2009a). Por outro lado, seus potenciais anticoagulantes foram inferiores a HEP não-fracionada (193 UI mg<sup>-1</sup>). *U. fasciata*, *G. birdiae*, *G. cornea* e *P. capillacea* possuem PS destituídos de atividade anticoagulante *in vitro*.

A atividade anticoagulante é uma das propriedades biológicas mais estudadas de PS e muitos desses compostos têm sido isolados e caracterizados de algas marinhas (Matsubara, 2004), porém pouco ainda se sabe sobre suas ações nos diferentes sistemas biológicos. A xilofucoglucurona sulfatada isolada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*, obtida por digestão enzimática com a protease alcalina maxatase de uma bactéria do gênero *Esporobacillus*, apresentou frações de PS com baixo potencial anticoagulante (6 e 22,80 UI mg<sup>-1</sup>) e sem efeito hemorrágico comparada a HEP (Leite *et al.*, 1998). Uma D-galactana sulfatada extraída por digestão enzimática (papaína) da alga marinha vermelha *B. occidentalis* apresentou uma potente atividade anticoagulante (150 UI mg<sup>-1</sup>), segundo Farias *et al.* (2000). Avaliando o potencial anticoagulante dos polissacarídeos extraídos em meio aquoso (25 °C) sob agitação, seguido por uma combinação de separação em colunas cromatográficas de troca iônica

(DEAE-toyoppearl) e exclusão molecular (G4000PWxL em gel de TSK), respectivamente, Matsubara *et al.* (2001) reportaram um efeito anticoagulante do PS isolado da alga marinha verde *C. cylindricum* semelhante a HEP (TTPA), embora com mecanismo de ação anticoagulante diferente.

**Tabela 2.** Atividade anticoagulante das frações polissacarídicas obtidas por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) de macroalgas marinhas coletadas no litoral do Estado do Ceará, Brasil

Espécies	Região de coleta	Fração	UI mg <sup>-1</sup> *
<b>Clorofíceas</b>			
<i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskal) J. Agardh	Praia do Pacheco	F II	17,09
<i>Ulva fasciata</i> Delile	Praia do Pacheco	-	-
<b>Rodofíceas</b>			
<i>Gracilaria birdiae</i> Palastino & Oliveira	Praia de Flecheiras	-	-
<i>G. cornea</i> J. Agardh	Praia de Flecheiras	-	-
<i>Pterocladia capillacea</i> (S.G. Gmelin) Santelices & Hommersand	Praia do Pacheco	-	-
<i>Solieria filiformis</i> (Kützinger) P.W. Gabrielson	Praia do Pacheco	F I	2,31
<b>HEP</b>	-	Não-fracionada	193,00

\* Atividade expressa em unidades internacionais por mg (UI mg<sup>-1</sup>) de polissacarídeo utilizando a HEP padrão, Sem atividade.

A extração dos PST, quando obtidos por extração aquosa, da clorofícea *C. racemosa* resultou em PS capazes de modificar o TTPA normal e também exibiram atividade antiviral (Ghosh *et al.*, 2004). Uma galactana sulfatada extraída da rodofícea *G. crinale*, também obtida segundo o método descrito por Farias *et al.* (2000) e brevemente modificado neste trabalho, apresentou atividade anticoagulante (65 UI mg<sup>-1</sup>) mediante uma combinação de procedimentos cromatográficos (Pereira *et al.*, 2005).

Avaliando o potencial anticoagulante de sete espécies de feofíceas (*Ecklonia cava*, *Ishige okamurage*, *Sargassum fulvellum*, *S. horneri*, *S. coreahum*, *S. thunbergii* e *Scytosipon lomentaria*), Athukorala *et al.* (2006) reportaram um efeito semelhante do polissacarídeo de *E. cava* comparado a HEP, quando digerido com carboidrases e purificado por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) seguido por gel filtração (Sephrose 4B). Polissacarídeos anticoagulantes de vinte e duas espécies de algas marinhas foram obtidos por Athukorala *et al.* (2007), a partir da extração aquosa e seguida por purificação parcial com etanol absoluto. Quando as espécies previamente selecionadas *C. fragile* (clorofícea) e *S. horneri* (feofícea) foram submetidas a extrações hidrolíticas utilizando diferentes enzimas sob condições ideais de pH e temperatura, seguido do fracionamento dos PS por membranas de micro-filtração, os TTPAs são consideravelmente prolongados em fragmentos maiores

(> 30 kDa). Mais recentemente, Pushpamali *et al.* (2008) isolaram uma galactana sulfatada da alga vermelha *Lomentaria catenata* extraída por fermentação com atividade anticoagulante superior a HEP. Rodrigues *et al.* (2009a) relataram a ocorrência da atividade anticoagulante *in vitro* em diferentes frações polissacarídicas, quando obtidas por DEAE-celulose, oriundas de três diferentes digestões com papaína da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia*.

Desta forma, PS de algas marinhas com atividade anticoagulante podem ser obtidos mediante a utilização de várias estratégias de extração e separação. Isso poderá resultar em variação no rendimento e a atividade biológica desses compostos (Percival & McDowell, 1967, Amorim, 2005, Bezerra-Neto *et al.*, 2008, Pushpamali *et al.*, 2008, Rodrigues *et al.*, 2009a). Além disso, estudos relacionados à variação sazonal de PS presentes na parede celular desses organismos, já que sua biossíntese pode variar entre diferentes épocas do ano (Craigie *et al.*, 1984, Christiaen *et al.*, 1987, Bird, 1988), são indicados (Rodrigues *et al.*, 2009a). As condições climáticas podem vir a influenciar o rendimento e as propriedades físico-químicas desses compostos (Bird, 1988), podendo comprometer suas diversas aplicações na indústria (Campo *et al.*, 2009).

Em suma, pouco ainda se sabe sobre os PS de algas marinhas, principalmente daqueles encontrados nas Chlorophytas. A seleção de diferentes espécies algais, com a finalidade de identificar novas macromoléculas biologicamente ativas, é fundamental para os estudos utilizando modelos de experimentação animal, ferramentas importantes no desenvolvimento de novas drogas (Mourão & Pereira, 1999, Farias, Nazareth & Mourão, 2001, Fonseca *et al.*, 2008, Assrey *et al.*, 2008). Neste sentido, a continuidade com essas investigações, a partir deste “screening”, também vem à desperta, por nosso grupo de pesquisa, futuros estudos com PS de algas. Essas pesquisas ainda poderão gerar novas fronteiras para o conhecimento sobre o papel evolutivo e ecológico desses compostos envolvidos no metabolismo primário desses organismos (Teixeira, 2002). Ademais, devido ao elevado valor comercial dos ficocolóides de algas (ágar, carragenanas e alginato) no mercado internacional, estudos que objetivem a utilizar esses organismos marinhos em maricultura poderão gerar oportunidades de negócio e renda às comunidades litorâneas.

## CONCLUSÃO

Polissacarídeos sulfatados isolados mediante digestão proteolítica (papaína), seguido de cromatografia em coluna de troca iônica (DEAE-celulose) de macroalgas marinhas resultou em frações destituídas de atividade anticoagulante *in vitro* na maioria das espécies utilizadas. No entanto, a utilização dessas moléculas em modelos de experimentação animal, com intuito de avaliar suas ações

nos diferentes sistemas biológicos, seria indicada. Estudos comparativos desses compostos, utilizando diferentes espécies, também poderiam gerar implicações na diferenciação desses organismos.

## REFERÊNCIAS

- Amorim, C.N. (2005). *Polissacarídeos sulfatados das algas marinhas vermelhas Gracilaria ornata Areschoug e Halymenia floresia (Clemente) C. Agardh: caracterização química e atividade biológica* [Dissertação de mestrado]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.
- 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.
- 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. (2008). Biological effects of a sulfated polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(4): 691-695.
- 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.
- Athukorala, Y., Jung, W.K., Vasanthan, T. & Jeon, Y.J. (2006). An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydrate Polymers*, 66(2): 184-191.
- Bezerra-Neto, J.T.B, Rodrigues, J.A.G., Pontes, G.C. & Farias, W.R.L. (2008). Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) HOWE: análise de metodologias de precipitação. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 3(2): 50-62.
- Bird, K.T. (1988). Agar production and quality from *Gracilaria* sp. strain G-16: effects of environmental factors. *Botanica Marina*, 31: 33-39.
- Campo, V.L., Kawano, D.F., Silva, D.B. & Carvalho, I. (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. *Carbohydrate Polymers*, 77(2): 167-180.
- Chargaff, F., Bancroft, F.W. & Stanley-Brown, M. (1936). Studies on the chemistry of blood coagulation II. On the inhibition on blood clotting by substances high molecular weight. *Journal of Biology Chemistry*, 115: 155-161.

Christiaen, D., Stadler, T., Ondarza, M. & Verdus, M.C. (1987). Structures and functions of the polysaccharides from the cell wall of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyceae, Gigartinales). *Hidrobiologia*, 151/152: 139-149.

Craigie, J.S., Wen, Z.C., Van Der Meer, J.P. (1984). Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of sugars from *Gracillaria* spp. *Botanica Marine*, 27: p.55-61.

Farias, W.R.L. (1987). Cultivo de algas marinhas no Estado do Ceará. In: *Seminário Nordestino de Pecuária, Fortaleza* (p.37-38). *Anais...* Fortaleza: Pecnordeste,

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. *Thrombosis and Haemostasis*, 86(6): p.1540-1546.

Farias, W.R.L., Valente, A.P., Pereira, M.S. & Mourão, P.A.S. (2000). 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*, 275(38): 29299-29307.

Farndale, R.W., Buttle, D.J. & Barrett, A.J. (1986). Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimistry et Biophysica Acta*, 883(2): p.173-177.

Fonseca, R.J.C., Oliveira, S.N.M.C.G., Melo, F.R., Pereira, M.G., Benevides, N.M.B. & Mourão, P.A.S. (2008). Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. *Thrombosis and Haemostasis*, 99(3): 539-545.

Ghosh, P., Adhikari, U., Ghosal, P.K., Pujol, C.A., Carlucci, M.J., Damonte, E.B. & Ray, B. (2004). In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry*, 65(23): 3151-3157.

Hayashi, K., Hayashi, T. & Kojima, I. (1996). A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex Vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *Aids Research and Human Retroviruses*, 12(15): p.1463-1471.

- Kloareg, B. & Quatrano, R.S. (1998). Structure of the cell wall of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharide. *Oceanography Marine Biological Annual Review*, 26: 29299-29307.
- Kjellén, L. & Lindahl, U. (1991). Proteoglycans: structure and interactions. *Annual Review of Biochemistry*, 60: 443-475.
- Leite, E.L., Medeiros, M.G.L., Rocha, H.A.O., Farias, G.G.M., Silva, L.F., Chavante, S.F. & Abreu, L.D., Dietrich, C.P., Nader, H.B. (1998). Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schöederi*. *Plant Science*, 132(2): 215-228.
- Matsubara, K. (2004). Recent advances in marine algal anticoagulants. *Current Medicinal Chemistry*, 2: 13-19.
- Matsubara, K., Matsubara, Y., Basic, A., Liao, M.L., Hori, K. & Miyazawa, K. (2001). Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(5): 395-399.
- Mourão, P.A.S. & Pereira, M.S. (1999). Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends Cardiovascular Medicine*, 9(8): 225-232.
- Nishiro, T., Aizu, Y. & Nagumo, T. (1991). The influence of sulfated content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed. *Ecklonia kurome*. *Thrombosis Research*, 64: 723-731.
- Painter, T.J. (1983). Algal polysaccharides. In: T.J. Painter (Ed). *The polysaccharides* New York (EUA): Ed. Academic Press,
- Percival, E. & McDowell, R.H. (1967). *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. New York: Academic Press,
- 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 the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action?. *Carbohydrate Research*, 340(12): 2015-2023.
- Pushpamali, W.A., Nikapitiya, C., Zoysa, M.D., Whang, I., Kim, S.J. & Lee, J. (2008). Isolation and purification of an anticoagulant from fermented red seaweed *Lomentaria catenata*. *Carbohydrate Polymers*, 73(2): 274-279.

- Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Chen, R., Zhang, H., Niu, X. & Li, Z. (2005). Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37: 195-199.
- Rodrigues, J.A.G., Torres, V.M., Alencar, D.B., Sampaio, A.H. & Farias, W.R.L. (2009a). Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. *Revista Ciência Agronômica*, 40(2): 16-29.
- Rodrigues, J.A.G., Júnior, J.S., Lourenço, J.A., Lima, P.C.W.C. & Farias, W.R.L. (2009b). Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofíceia *Halymenia pseudofloresia* mediante uma estratégia profilática. *Revista Ciência Agronômica*, 40(1): 71-78.
- Talarico, L.B., Pujol, C.A., Zibetti, R.G., Faria, P.C.S., Nosedá, M.D., Duarte, M.E.R. & Damonte, E.B. (2005). The antiviral activity of sulfated polysaccharide against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Research*, 66(2-3): 103-110.
- Teixeira, V.L. (2002). Produtos naturais marinhos. In: R. C. Pereira, A. Soares-Gomes (Ed.). *Biologia Marinha* (pp.249-279). Rio de Janeiro (RJ): Ed. Interciência,
- Thomas, D.P. (1997). Does low molecular weight heparin cause less bleeding?. *Thrombosis and Haemostasis*, 78(6): 1422-1425.
- Van De Velde, F., Pereira, L. & Rollema, H.S. (2004). The revised NMR chemical shift data of carrageenan. *Carbohydrate Research*, 339: 2309-2313.
- 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 haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacological Research*, 48(2): 151-155.
- Zhang, H.J., Mao, W.J., Fang, F., Li, H.Y., Sun, H.H., Chen, Y. & Qi, X.H. (2008). Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. *Carbohydrate Polymers*, 71(3): 428-434.