

FRACIONAMENTO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SOBRE A COAGULAÇÃO SANGUÍNEA DE FUCANAS SULFATADAS DE UM HIDROLISADO ENZIMÁTICO OBTIDO DA FEOFÍCEA *Spatoglossum schroederi* (MERTENS) KÜTZING

José Ariévil Gurgel RODRIGUES^{1,*} & Norma Maria Barros BENEVIDES^{1,2,*}

Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará - UFC

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará - UFC

*e-mail: arieviloengpesca@yahoo.com.br, nmbb@ufc.br

Recebido em 28 de maio de 2008

Resumo - Fucanas sulfatadas (FS) são polímeros aniônicos complexos e heterogêneos encontrados em grandes quantidades nas algas marinhas pardas. A obtenção desses compostos é influenciada pela utilização de diferentes protocolos de extração. Desta forma, neste trabalho objetivou-se fracionar e avaliar possíveis efeitos de FS obtidas do hidrolisado enzimático da alga parda *Spatoglossum schroederi* na coagulação sanguínea. As FS foram extraídas com papaína bruta em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM, seguida por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) utilizando um gradiente de NaCl, sendo as frações de FS monitoradas por metacromasia e açúcares totais (AT). Uma fração rica em FS foi avaliada quanto à presença de ácido urônico (AU) e analisada por eletroforese em gel de agarose a 0,5%. O teste do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) foi utilizado para avaliar possíveis efeitos das FS sobre a coagulação sanguínea, usando plasma humano normal. O rendimento de FS foi 22,98% e o perfil cromatográfico indicou a separação de duas diferentes frações de FS (F I e F II), eluídas nas concentrações 0,50 e 0,70 M de NaCl, respectivamente, com elevado teor de AT. Em F I também foi detectada AU e a eletroforese revelou a ocorrência de duas FS, com densidades de cargas diferentes entre elas. Os resultados foram divergentes quando comparados a outros estudos já realizados com a espécie. *S. schroederi* apresentou FS que não alteraram o TTPA normal. Portanto, a pesquisa demonstrou a detecção de duas FS destituídas de atividade anticoagulante *in vitro*.

Palavras-chave: feofíceas, polissacarídeos sulfatados, digestão proteolítica, teste do TTPA.

FRACTIONATION AND EVALUATION OF EFFECTS ON BLOOD COAGULATION OF SULFATED FUCANS OF AN ENZYMATIC HYDROLYSATE OBTAINED FROM *Spatoglossum schroederi* (MERTENS) KÜTZING

Abstract - Sulfated fucans (SF) are complex and heterogeneous anionic polymers found in high concentrations in brown seaweeds. However, the use of different protocols can influence the obtaining of these compounds. The aim of this study was to fractionation and evaluate possible effects of SF obtained from the enzymatic hydrolysate from the brown alga *Spatoglossum schroederi* on blood coagulation. SF were extracted with crude papain in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA, followed by ion-exchange chromatography (DEAE-cellulose) using a NaCl gradient, being the SF fractions monitored by metachromasia and total sugars (TS). A rich fraction of SF was measured uronic acid (UA), and then submitted to 0.5% agarose gel electrophoresis. The activated partial thromboplastin time (APTT) test was used to evaluate a possible effect of SF on blood coagulation, using normal human plasma. The yield of SF was 22.90%, and the chromatographic profile indicated the separation into two different fractions of SF (F I and F II) eluted in concentrations of 0.50 and 0.75 of NaCl, respectively, with high level of TA. UA was also detected in F I, and two SF differing in their charge density were revealed by electrophoresis. The results were considered different when compared to other studies already reported to the species. SF from *S. schroederi* had no influence on normal APTT. Therefore, this study showed the presence of two SF devoid of *in vitro* anticoagulant activity.

Key-words: Phaeophyceae. Sulfated polysaccharides. Proteolysis digestion. APTT test.

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

INTRODUÇÃO

Algas marinhas pardas são ricas em fucanas sulfatadas (FS), polímeros de açúcares repetitivos complexos e heterogêneos dotados de radicais sulfatos os quais são componentes da matriz extracelular. Esses compostos são principalmente constituído de α -L-fucopiranoose, unidas por ligações glicosídicas tipo 1→2 e com sulfato na posição 4 (Percival & McDowell, 1967). Pesquisas ainda revelam à presença de FS em invertebrados marinhos e, assim como nas algas marinhas (Leite *et al.*, 1998; Mourão, 2004; Azevedo *et al.*, 2009), despertando interesse nas ciências médicas (Mourão & Pereira, 1999; Pereira, Melo & Mourão, 2002).

A heparina (HEP) é um glicosaminoglicano variavelmente sulfatado alternativamente ligado por resíduos de ácido urônico e D-glicosamina. A HEP não-fracionada e aquelas de baixo peso molecular são atualmente as drogas anticoagulantes mais utilizadas na clínica médica. Entretanto, a utilização desse polissacarídeo sulfatado (PS) é potencialmente acompanhada por efeitos colaterais, tais como sangramento e trombocitopenia (Mourão & Pereira, 1999; Zancan & Mourão, 2004). A baixa qualidade das preparações comerciais de HEP disponíveis para cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea também tem levado preocupação no mercado internacional (Melo, Pereira, Cunha, Sá & Mourão, 2008) e motivado a busca por novas biomoléculas em substituição a HEP (Mourão & Pereira, 1999; Athukorala, Jung, Vasanthan, Jeon, 2006; Fonseca *et al.*, 2008; Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009a; Rodrigues, Vanderlei, Queiroz, Quinderé & Benevides, 2009b).

A considerável variação estrutural entre os diferentes PS obtidos de diferentes espécies de algas marinhas e a coleta desses organismos em diferentes ambientes ou períodos do ano contribui para a natureza complexa e heterogênea desses compostos (Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000; Percival & McDowell, 1967). Tais condições podem ocasionar variação nos rendimentos dessas moléculas e suas atividades biológicas, quando também empregadas diferentes metodologias de obtenção. Esses estudos, por outro lado, podem vir a ajudar na melhor compreensão na natureza das relações estrutura/função biológica dessas moléculas com relação, por exemplo, no sistema de coagulação sanguínea (Zancan & Mourão, 2004; Fonseca *et al.*, 2008).

A alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* (Mertens) Kützing é nativa no litoral cearense e possui FS como os principais constituintes de parede celular. Estudos anteriores demonstraram que essas moléculas apresentam baixa atividade anticoagulante e não propiciam efeitos hemorrágicos. Assim como a HEP, esses polissacarídeos estimulam a síntese de heparan sulfato antitrombótico a partir de células endoteliais em cultura (Leite *et al.*, 1998). Mais recentemente, Rocha *et al.* (2005), avaliando uma FS dessa mesma espécie, relataram o polímero destituído de atividade anticoagulante *in vitro*, mas com atividade antitrombótica *in vivo*. A utilização dessas FS

por Lima, Torres, Rodrigues, Sousa & Farias (2009), em processos de imunestimulação com camarões *Litopenaeus vannamei*, também resultou na melhoria da sobrevivência dos animais, quando em condições de hipoxia.

Portanto, a presente pesquisa teve como objetivo fracionar e avaliar os efeitos sobre a coagulação sanguínea de FS da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*, quando obtidas enzimaticamente e concentradas por liofilização.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DA ALGA MARINHA E EXTRAÇÃO DAS FS

Exemplares da alga marinha parda *S. schroederi* foram coletados na zona entre marés da Praia do Pacheco-Caucaia-Ceará (Julho/2008) e a pesquisa desenvolvida no laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. A extração das FS foi realizada segundo Farias, Valente, Pereira & Mourão (2000), com algumas modificações. Brevemente, a alga desidratada (25 °C) e macerada com N₂ líquido (5 g) foi digerida com papaína bruta (30 mg mL⁻¹) em 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) (Vetec Química) contendo EDTA 5 mM (QEEL) e cisteína 5 mM (Sigma Chemical) em banho-maria (MARCONI, modelo MA 159) durante 6 h 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. Logo após a precipitação, o extrato foi novamente centrifugado, lavado com 200 mL de CCP 0,05%, dissolvido em 174 mL de NaCl 2 M: etanol comercial (100:15; v v⁻¹) e precipitado com 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, também com o mesmo volume, de etanol comercial, quando finalmente foi dialisado e liofilizado para a obtenção das FS (Figura 1).

FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (DEAE-CELULOSE)

As FS (15 mg) foram dissolvidas (2 mg mL⁻¹) em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) e submetidas à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose (12 × 1,5 cm) (Sigma Chemical) equilibrada e percolada com o mesmo tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) até a completa remoção dos polissacarídeos não retidos, seguido do fracionamento dos PS por eluição (stepwise) com adição de NaCl em diferentes concentrações (0,50 e 0,75 M; F I e F II, respectivamente) utilizando um coletor de frações (FRAC-920) com fluxo ajustado (60 mL h⁻¹). As frações de FS (3,0 mL) foram monitoradas através da propriedade metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno (Farndale, Buttle & Barrett, 1986) em espectrofotômetro, ajustado a 525 nm. O

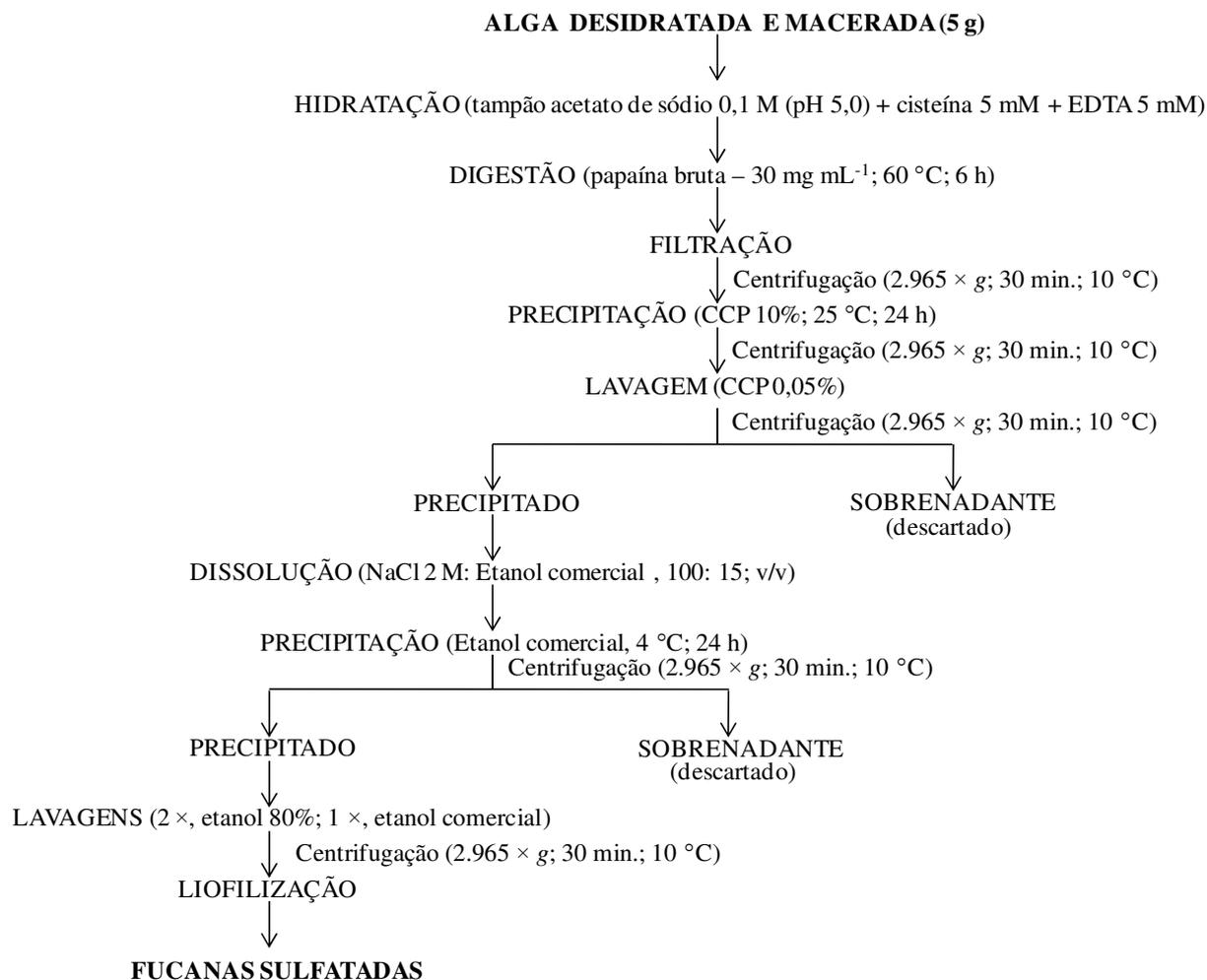


Figura 1. Fluxograma de obtenção das FS da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*.

monitoramento de açúcares totais (AT) usando o método fenol-ácido sulfúrico (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956) também foi realizado por espectrometria a 490 nm. Finalmente, as frações metacromáticas obtidas foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e concentradas por liofilização para os ensaios posteriores.

ANÁLISES QUÍMICAS

O conteúdo de proteínas contaminantes (PC) foi estimado pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão. A determinação de sulfato foi realizada através da medida da área metacromática integrada do perfil cromatográfico em DEAE-celulose, utilizando o programa ORIGIN 7.0 (Rodrigues, Vanderlei, Queiroz, Quinderé & Benevides, 2009b).

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A FS e as frações de FS (25 µg) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão 1,3 - acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0) (Aldrich). As FS foram aplicadas no gel e a corrida foi realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após o procedimento, as amostras presentes no gel foram fixadas com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio a 0,1% (Vetec Química) por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina a 0,1% (Vetec Química) e, finalmente, descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v/v/v), como descrito por Dietrich & Dietrich (1976).

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA POR GRADIENTE LINEAR DE NaCl E DETECÇÃO DE ÁCIDO URÔNICO (AU)

Para melhor caracterização das FS isoladas, uma amostra da fração F I (5 mg) foi dissolvida em 1 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) e submetida à cromatografia de troca iônica por gradiente linear de NaCl (0,00-0,80 M) (6,5 × 1,0 cm), utilizando um coletor de frações (FRAC-920) com fluxo ajustado (90 mL h⁻¹). As frações de FS (1,5 mL) foram monitoradas através da propriedade metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno (Farndale, Buttle & Barrett, 1986) e teor de ácido urônico através do método carbazol-ácido sulfúrico descrito por Dische (1962) em espectrofotômetro AMERSHAM BIOSCIENCES ULTROSPEC 1100 ajustado a 525 nm, para ambas as determinações.

AVALIAÇÃO DO TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (TTPA)

A avaliação da atividade anticoagulante foi realizada através do teste do 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 triplicata, sendo o tempo de coagulação registrado automaticamente em um coagulômetro (DRAKE, modelo QUICK-TIMER). Utilizou-se uma curva padrão de HEP não fracionada (193 UI mg⁻¹) neste ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RENDIMENTO DAS FS

Vários métodos podem ser empregados para isolamento de PS de algas marinhas (Percival & McDowell, 1967; Leite *et al.*, 1998; Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000; Athukorala, Jung,

Vasanthan, Jeon, 2006; Fonseca *et al.*, 2008; Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009a), peixes (Rodrigues, Vanderlei, Queiroz, Quinderé & Benevides, 2009b), dentre outros.

No presente estudo, o emprego da enzima papaína durante o processo de extração e CCP na etapa de precipitação das FS presentes na parede celular da feofíceia *S. shroederi* resultou em um rendimento médio de 22,98%, a partir do tecido da alga desidratado e macerado. Esse rendimento foi superior quando comparado ao obtido da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* (4,00%) (Farias, Valente, Pereira & Mourão, 2000), mas foi inferior a feofíceia *Ecklonia cava* (41,50%) segundo Athukorala, Jung, Vasanthan, Jeon, (2006) e a primeira extração da alga *Halymenia pseudofloresia* (40,50%) (Rodofíceia) (Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009a). Em um estudo anterior utilizando a alga *S. shroederi*, Lima, Torres, Rodrigues, Sousa & Farias (2009) obtiveram 40% de rendimento de FS após secagem em estufa (60 °C; 24 h). A maioria desses estudos também utilizou a papaína (60 °C; 24 h). Desta maneira, a utilização de diferentes espécies, métodos e condições de obtenção podem ocasionar variação nos rendimentos desses compostos. Portanto, a extração de FS com papaína (60 °C; 6 h) seguida do procedimento de diálise e secagem por liofilização da alga *S. shroederi* proporcionou um bom rendimento de carboidratos sulfatados.

FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (DEAE-CELULOSE)

O perfil cromatográfico obtido em coluna de troca iônica (DEAE-celulose) mostrou a separação de duas diferentes frações de FS (F I e F II), eluídas nas concentrações 0,50 e 0,75 M de NaCl, respectivamente (Figura 2). O perfil da dosagem de AT também foi semelhante ao metacromático. A maior AMI (73,59%) e rendimento de FS (40%) foi obtida na fração F I, eluída com 0,50 M de NaCl, em relação a F II obtida do táxon. PC não foram detectadas, sugerindo a eficiência da digestão enzimática de proteínas pela papaína durante a extração das FS (Rodrigues, Vanderlei, Quinderé, Fontes & Benevides, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1. Área metacromática integrada (AMI), rendimento (RE), proteínas contaminantes (PC) das frações da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*.

Frações	Eluição (NaCl)	AMI (%)	RE (%)	PC *
F I	0,50	73,59	40,00	-
F II	0,75	26,41	nd	nd

* Dosado pelo método Bradford (1976)

-: Não detectado;

nd: Não determinado.

A matriz trocadora aniônica DEAE-celulose é comumente empregada em procedimentos que objetivem a separação de PS (Percival & McDowell, 1967; Athukorala, Jung, Vasanthan, Jeon, 2006; Fonseca *et al.*, 2008; Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009a; Rodrigues, Vanderlei, Queiroz, Quinderé & Benevides, 2009b). Avaliando o resultado do fracionamento dos PS obtidos por cromatografia de troca iônica de *S. schroederi*, Leite *et al.* (1998) constataram a separação de oito diferentes frações polissacarídicas eluídas com 0,15; 0,30; 0,50; 0,70; 1,00; 1,50; 2,00 e 3,00 M de NaCl. Todas as frações foram constituídas de ácido urônico, fucose e xilose, porém em diferentes proporções. O maior teor de açúcar foi detectado na fração eluída em 0,50 M de NaCl, assim como no presente estudo (Figura 2). Possivelmente seja ácido algínico, como também identificado por Leite *et al.* (1998). Contudo, somente duas frações polissacarídicas foram obtidas neste trabalho, sugerindo que a metodologia de obtenção ou a época de coleta da alga *S. schroederi* poderiam explicar os resultados aqui apresentados.

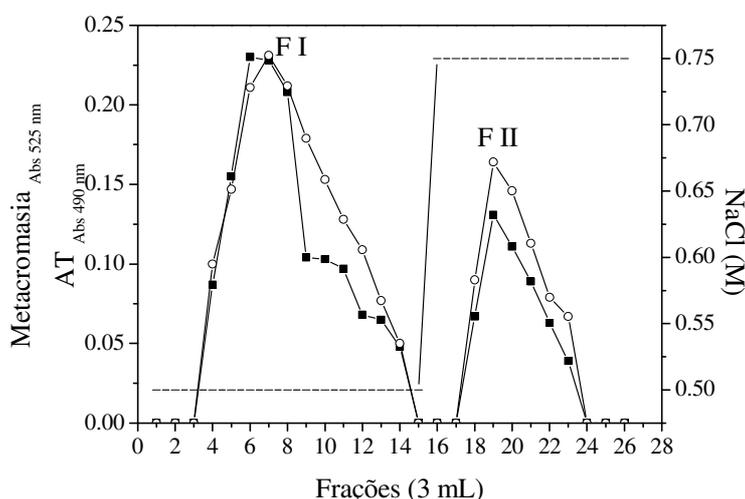


Figura 2. Purificação por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose das FS isoladas da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0). As FS adsorvidas no gel foram eluídas com NaCl em diferentes concentrações (0,50 e 0,75 M). (□□□) metacromasia; (□□□) açúcares totais (AT); (□) concentração de NaCl (M).

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O procedimento de eletroforese em gel de agarose revelou a presença de duas bandas metacromáticas distintas no EB e a fração F I (Figura 3). A mistura de FS encontrada no EB e fração F I (0,50 M de sal) também mostraram bandas com mobilidades semelhantes entre si no perfil eletroforético, sendo a banda inferior mais carregada quando comparada a superior. Desta forma, o procedimento de eletroforese sugere a identificação preliminar de duas FS presentes no hidrolisado enzimático obtido de *S. schroederi*. A fração F II, eluída com 0,75 M de sal, não foi reunida devido à escassez de material na amostra para análise.

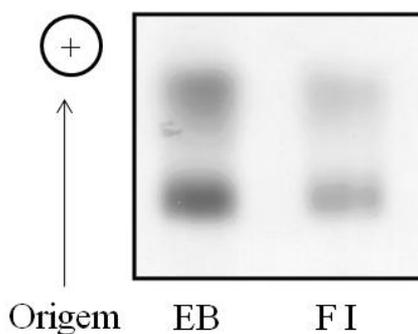


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 0,5% das FS isoladas da alga marinha parda *Spatoglossum shroederi*. O extrato bruto (EB) e a fração F I de FS presentes no gel foram corados com azul de toluidina a 0,1%.

A utilização da protease alcalina maxatase de uma bactéria do gênero *Sporobacillus* no processo de extração e fracionamento por cromatografia de troca iônica dos carboidratos sulfatados da alga marinha parda *S. schröderi*, revelou, por eletroforese, bandas homogêneas em cargas negativas segundo Leite *et al.* (1998), enquanto três diferentes fucanas (A, B e C) foram identificadas por Rocha & Leite (2008), também utilizando a mesma espécie. Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, (2009a) observaram que moléculas com padrão de resolução bastante polidisperso em cargas negativas são obtidas na primeira extração dos PS da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia* e tornaram-se mais purificadas no decorrer de duas novas digestões com papaína, a partir do mesmo tecido, quando os polissacarídeos foram secos em estufa (60 °C; 24 h).

Neste trabalho, o emprego da matriz trocadora aniônica DEAE-celulose resultou em uma mistura de moléculas (Figura 3), sugerindo a baixa eficiência do procedimento de separação desses compostos. Tal fato pode ser justificado em razão da complexidade e heterogeneidade dessas FS isoladas de *S. schroderi*, quando a espécie foi coletada para a realização deste estudo. Segundo Percival & McDowell (1967), a biossíntese e composição química desses compostos podem variar de acordo com as condições climáticas ambientais. Os fatores de temperatura, luminosidade e a concentração de nutrientes na água variam com a localidade e estação do ano. Neste trabalho, o método utilizado para obtenção desses polissacarídeos também poderia ter influenciado os resultados da pesquisa. Estudos posteriores relacionados à investigação da fração F II obtida da espécie também seriam indicados.

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA POR GRADIENTE LINEAR DE NaCl E DETECÇÃO DE ÁCIDO URÔNICO (AU)

Para melhor investigar a fração F I, uma nova coluna de troca iônica usando um gradiente linear de NaCl foi utilizada (Figura 4). Assim, o perfil cromatográfico de FS indicou pico metacromático único. Na detecção de AU, a dosagem pelo método carbazol-ácido sulfúrico

(Dische, 1962) indicou dois picos de polissacarídeos ácidos, reforçando assim a presença deste açúcar em estudos já reportados para a espécie *S. schroederi* (Leite *et al.*, 1998) e outras algas feofíceas (Percival & McDowell, 1967). Porém, tal fato não justifica a ocorrência duas diferentes bandas de FS no perfil eletroforético (Figura 3).

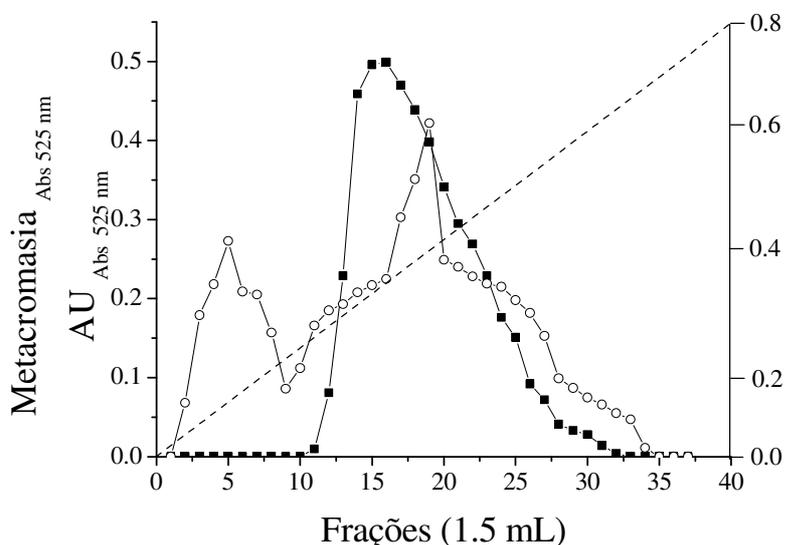


Figura 4. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose da fração F I de FS isolada da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0). As FS adsorvidas no gel foram eluídas mediante gradiente de NaCl (0,00 a 0,80 M). (□□□) metacromasia; (□□□) ácido urônico (AU); (□) gradiente de NaCl (M).

TESTE DO TTPA

Novos heparinóides têm sido investigados a partir de tecidos de diferentes origens (Leite *et al.*, 1998; Mourão & Pereira, 1999; Pereira, Melo & Mourão, 2002; Mourão, 2004; Rocha *et al.*, 2005; Athukorala, Jung, Vasanthan, Jeon, 2006; Fonseca *et al.*, 2008; Azevedo *et al.*, 2009; Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009a; Rodrigues, Vanderlei, Queiroz, Quinderé & Benevides, 2009b; Rodrigues, Vanderlei, Quinderé, Fontes & Benevides, 2010), sendo o teste do TTPA um dos mais usados na mensuração de PS com atividade anticoagulante, o qual indica com precisão o potencial anticoagulante do composto isolado (Mourão & Pereira, 1999). Assim, a fração polissacarídica F I, eluída com 0,50 M de NaCl, da alga marinha parda *S. schroederi*, foi mensurada. Entretanto, a uma elevada concentração de FS (1,00 mg mL⁻¹; TTPA = 34,10 s), a referida fração não foi capaz de prolongar o TTPA em relação ao plasma humano normal (33,00 s), enquanto a uma concentração mínima de 0,10 mg mL⁻¹ de HEP não-fracionada prolongou o TTPA (40,15 s). Isto sugere que, para o teste *in vitro* utilizado, a fração F I não promoveu naturalmente a inibição da via intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação quando comparada a outros trabalhos

(Athukorala, Jung, Vasanthan, Jeon, 2006; Azevedo *et al.*, 2009; Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009a; Rodrigues, Vanderlei, Quinderé, Fontes & Benevides, 2010).

Avaliando FS isoladas da mesma espécie utilizada neste trabalho, Leite *et al.* (1998) obtiveram frações com atividades anticoagulantes variando de 4,7 a 22,40 UI mg⁻¹ e com efeitos no tempo de sangramento que praticamente não variaram (0,30 a 0,50 min), quando comparados aqueles da HEP (150,00 UI; > 30 min), respectivamente. Os pesquisadores ainda reportaram que a xilofucoglucurona isolada de *S. schroederi* promoveu uma elevada atividade na síntese de heparan sulfato antitrombótico, um PS obtido de animais, a partir de células endoteliais em cultura. Estendendo esses estudos, Rocha *et al.* (2005) isolaram uma outra FS da alga *S. schroederi* e constataram que ela, mesmo destituída de atividade anticoagulante *in vitro*, foi capaz de induzir a redução na formação de trombos tempo-dependente em experimentos *in vivo*. Essa ação foi associada com a síntese de heparan sulfato antitrombótico de células endoteliais e a inibição do fator Xa da coagulação sanguínea. Mesmo em concentrações altas da FS isolada ela também não propiciou eventos hemorrágicos.

Segundo Mourão & Pereira (1999), a busca por novos compostos anticoagulantes e antitrombóticos decorre do fato dos efeitos indesejáveis da HEP para tratamento de pessoas acometidas por patologias cardiovasculares diversas, limitando-se assim o uso terapêutico da droga. Normalmente, o estudo dessas moléculas tem sido acompanhado mediante sua utilização em modelos de experimentação animal de trombose. Fonseca *et al.* (2008) compararam duas galactanas sulfatadas isoladas das rodofíceas *B. occidentalis* e *Gelidium crinale*. Seus distintos efeitos são decorrentes de suas proporções e/ou distribuição dos radicais sulfatos na estrutura química e seus mecanismos de interação com proteases, inibidores e ativadores do sistema de coagulação. A finalidade do estudo foi elucidar as relações dos PS nas atividades anti- e pró-coagulantes, além das ações anti- e pró-trombóticas desses compostos. Os autores propuseram ainda a utilização de polissacarídeos de *G. crinale*, que apresentam efeitos pró-coagulantes em baixas doses, como promissores agentes terapêuticos para pacientes acometidos por hemofilia e/ou outras doenças com deficiências de fatores de coagulação. Para Mourão & Pereira (1999), é interessante comparar dose requerida para a ação antitrombótica em conjunto com outros fatores, tais como 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 por diferentes rotas, para assim avaliar o papel particular de cada polissacarídeo a ser investigado no sistema homeostático.

Neste trabalho, FS isoladas mediante digestão proteolítica não demonstraram ação anticoagulante *in vitro* pelo teste do TTPA. Rocha & Leite (2008), também estudando FS de *S. schroederi*, identificaram três tipos de fucanas (A, B e C), também destituídas de atividade

anticoagulante, onde curiosamente a FS A, quando administrada em ratos, impediu a formação de trombos nos animais de forma tempo-dependente. Quando os pesquisadores investigaram seu efeito antitrombótico, observaram que a molécula se liga a matriz extracelular das células endoteliais, desencadeando uma via de sinalização que culmina com a síntese de heparan sulfato *in vivo*. Este fato veio então a justificar aquele efeito previamente reportado por Leite *et al.* (1998), a partir da produção do glicosaminoglicano a partir da cultura de células *in vitro*. Essa abordagem de investigação também sugere para posteriores estudos envolvendo a fração F I obtida de *S. schroederi* neste trabalho, de forma a identificar qual fucana estaria possivelmente envolvida à função sinalizadora.

Portanto, a ação das FS isoladas de *S. schroederi* não ocorre meramente como uma função de densidade de cargas e a detecção de uma ação anticoagulante prévia também não é pré-requisito para atividade antitrombótica. Segundo Mourão (2004), estudos relacionados à composição monossacarídica, posição de grupos sulfatos e principalmente na ocorrência de unidades dessulfatadas também devem ser considerados como pré-requisitos de atividade.

Azevedo *et al.* (2009) isolaram um FS da alga marinha parda *Fucus vesiculosus* com atividade anticoagulante (TTPA) dependente do conteúdo de sulfato e peso molecular. O composto também exibiu alta atividade de agregação plaquetária em baixas doses com efeito inverso em elevadas concentrações, porém sem parecer ter relação com o teor de sulfato, e baixo efeito hemorrágico quando comparado a HEP não-fracionada.

Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias (2009a) reportaram uma 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 (464,20; 211,60; 103,50 e 101,70 UI mg⁻¹) foram superiores quando comparadas aquelas da terceira (137,10; 96,50 e 89,20 UI mg⁻¹) extrações, respectivamente, sendo, portanto, superiores ao padrão de HEP utilizado (100,00 UI mg⁻¹). Quando esses mesmos polissacarídeos, obtidos da extração de maior rendimento, foram utilizados em bioensaios na água de cultivo do camarão *L. vannamei*, foi observado que o composto também proporcionou uma melhora na taxa de sobrevivência, qualidade no ganho de peso e consumo alimentar dos animais durante o período de aplicação dos PS, sugerindo assim uma ação imunoestimulante (Rodrigues, Júnior, Lourenço, Lima & Farias, 2009c) e demonstrando sua utilização em outros processos biotecnológicos. De acordo com Bricknell & Dalmo (2005), o uso de imunoestimulantes na aquicultura é recomendado quando o risco de doenças é mais elevado, melhorando o estado de saúde dos organismos aquáticos, quando os animais são expostos à situação de estresse.

Neste contexto, o estudo reportado por Rocha & Leite (2008) também poderia abrir novas fronteiras de investigação quanto à imunidade inata de crustáceos. A ação imunoestimulante expressa por esses compostos, em bioensaios que objetivem reduzir o estresse (agente imunossupressor) dos organismos aquáticos, poderia resultar no desenvolvimento de estratégias mais seguras no cultivo desses animais. Recentemente, Lima *et al.* (2009) avaliaram o efeito da administração do extrato polissacarídico da alga *S. schroederi* em camarões *L. vannamei*, quando em imersões nas concentrações 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de polissacarídeo. Os resultados mostraram que, somente na maior dosagem administrada do composto na água de cultivo dos animais, foi capaz de reduzir significativamente a mortalidade, quando em condições de hipoxia.

CONCLUSÃO

O protocolo utilizado para obtenção de FS da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* é eficiente. O procedimento de cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) separa duas frações polissacarídicas, porém revelando por eletroforese, a ocorrência de duas FS. O teste do TTPA indica que elas são destituídas de atividade anticoagulante *in vitro*. Os resultados sugerem a identificação posterior de qual delas poderia exercer um mecanismo de ação relacionado à síntese de heparam sulfato antitrombótico e para investigação em outros sistemas biológicos, como já descritos em estudos anteriores. Contudo, sugere-se que pesquisas relacionadas à variação sazonal desses compostos sejam realizadas.

REFERÊNCIAS

- Azevedo, T.C.G., Bezerra, M.E.B., Santos, M.G.L., Souza, L.A., Marques, C.T., Benevides, N.M.B. & Leite, E.L. (2009). Heparinoids algal and their anticoagulant hemorrhagic activities and platelet aggregation. *Biom. Pharm.*, 63(7):477-483.
- Athukorala, Y., Jung, W.K., Vasanthan, T. & Jeon, Y.J. (2006). An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. *Carbohydr. Polym.*, 66(2):184-191.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2): 248-254.
- Bricknell, I. & Dalmo, R.A. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shell. Immunol.*, 19(5):457-272.
- Dietrich, C.P. & Dietrich, S.M.C. (1976). Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal. Biochem.*, 70(2):645-647.

- Dische, Z. (1962). Color reactions of hexuronic acids. *In: R.L. Wistler & M.L. Wolfrom. Methods of carbohydrate chemistry.* (pp.467-501). Academic press.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28(3):350-356.
- 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. *J. Biol. Chem.*, 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. *Biochim. Biophys. Acta*, 883(2):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. *Thromb. Haemost.*, 99(3):539-545.
- 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.
- Lima, P.C.W.C., Torres, V.M., Rodrigues, J.A.G., Sousa, J.J. & Lobo, W.R. (2009). Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* em juvenis de *Litopenaeus vannamei*. *Rev. Ciên. Agron.*, 40(1):79-85.
- Melo, E.I., Pereira, M.S., Cunha, R.S., Sá, M.P.L. & Mourão, P.A.S. (2008). Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. *Rev. Bras. Cir. Cardiov.*, 23(2):169-174.
- Mourão, A.P.S. (2004). Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. *Curr. Pharm. Des.*, 10(9):967-981.
- Mourão, P.A.S. & Pereira, M.S. (1999). Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. *Tren. Cardiov. Med.*, 9(8):225-232.
- Percival, E. & McDowell, R.H. (1967). *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. New York: Academic Press.
- Pereira, M.S., Melo, F.R. & Mourão, P.A.S. (2002). Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology*, 12(10):573-580.

Rocha, H.A.O. & Leite, E.L. (2008). A quebra de um paradigma: polissacarídeos de macroalgas marrons sem atividade anticoagulante “in vitro” possuem atividade antitrombótica “in vivo”. In: *Congresso Nacional de Botânica* (pp. 404-405). Natal. Anais do CNB, 59.

Rocha, H.A.O., Moraes, F.A., Trindade, E.S., Franco, C.R.C., Torquato, R.J.S., Veiga, S.S., Valente, A.P., Mourão, P.A.S., Leite, E.L., Nader, H.B. & Dietrich, C.P. (2005). Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent? *J. Biol. Chem.*, 280(50):41278-41288.

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*. *Rev. Ciên. Agron.*, 40(2):224-231.

Rodrigues, J.A.G., Vanderlei, E.S.O., Queiroz, I.N.L., Quinderé, A.L.G. & Benevides, N.M.B. (2009b). Purificação e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados da pele da carpa comum, *Cyprinus carpio*. *Rev. Ciên. Agron.*, 40(3):381-387.

Rodrigues, J.A.G.; Júnior, J.S., Lourenço, J.A., Lima, P.C.W.C. & Farias, W.R.L. (2009c). Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Halymenia pseudofloresia* mediante uma estratégia profilática. *Rev. Ciên. Agron.*, 40(1):71-78.

Rodrigues, J.A.G., Vanderlei, E.S.O., Quinderé, A.L.G., Fontes, B.P. & Benevides, N.M.B. (2010). Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, fracionamento e atividade anticoagulante. *Acta Scien. Biol. Scien.*, 32(2):113-120.

Zancan, P. & Mourão, P.A.S. (2004). Venous and arterial thrombosis in the rat models: dissociation of the antithrombotic effects of glycosamonioglycans. *Blood Coagul. Fibrin.*, 15:45-54.