

Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, fracionamento e atividade anticoagulante

José Ariévilo Gurgel Rodrigues¹, Edfranck de Sousa Oliveira Vanderlei², Ana Luíza Gomes Quinderé², Bruno Pedrosa Fontes² e Norma Maria Barros Benevides^{2*}

¹Rede Nordeste de Biotecnologia, Av. Paranjana, 1700, 60740-000, Campus do Itaperi, Fortaleza, Ceará, Brasil. ²Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, Ceará, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: nmabb@ufc.br

RESUMO. A incidência de doenças cardiovasculares e os efeitos adversos da heparinoterapia têm motivado a busca por novos agentes terapêuticos e os polissacarídeos sulfatados (PS) de algas marinhas têm sido reportados como fontes alternativas para tal. Objetivou-se avaliar o potencial anticoagulante dos PS totais (PST) isolados e fracionados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides*. Inicialmente, os PST foram extraídos com papaína em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM, seguidos de fracionamento em coluna de troca iônica de DEAE-celulose com gradiente de NaCl. As frações obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 0,5% e a atividade anticoagulante, mensurada pelo tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), usando-se plasma humano normal e comparada a uma curva-padrão de heparina (193 UI mg⁻¹). Verificaram-se semelhantes perfis cromatográficos entre os PS de ambas as espécies, porém com padrões de mobilidades distintas quando as frações foram comparadas por eletroforese. Os PS modificaram o TTPA, cujas atividades anticoagulantes foram de apenas 21,23 e 24,36 UI mg⁻¹, quando eluídos com 0,75 M de sal para *C. racemosa* e *C. cupressoides*, respectivamente. Portanto, PS anticoagulantes isolados das clorofíceas *C. racemosa* e *C. cupressoides* resultaram em efeitos anticoagulantes inferiores aos da heparina. Estudos comparativos dessas moléculas também são sugeridos como ferramentas auxiliares na identificação de algas do mesmo gênero.

Palavras-chave: algas verdes, macromoléculas sulfatadas, coagulação sanguínea, TTPA.

ABSTRACT. Sulfated polysaccharides isolated from *Caulerpa racemosa* and *Caulerpa cupressoides* (Chlorophyceae) – extraction, fractionation and anticoagulant activity. – The incidence of cardiovascular diseases and adverse effects from heparintherapy have led to a search for new therapeutic agents, and the sulfated polysaccharides (SP) of seaweeds have been reported as alternative sources. The aim of this work was to evaluate the anticoagulant potential of total SP (TSP) isolated and fractionated from *Caulerpa racemosa* and *Caulerpa cupressoides* (Chlorophyceae). Initially, the TSP were extracted with papain in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA, followed by fractionation on ion exchange DEAE-cellulose column with NaCl gradient. The obtained fractions were analyzed by 0.5% agarose gel electrophoresis and the anticoagulant activity measured by the activated partial thromboplastin time (APTT) using normal human plasma, and compared to a standard heparin curve (193 IU mg⁻¹). Similar chromatographic profiles of SP were shown on both species, but with distinct mobility patterns, when the SP fractions were compared by electrophoresis. SP eluted with 0.75 M of NaCl modified the APTT, whose anticoagulant activities were only 21.23 and 24.36 IU mg⁻¹ for *C. racemosa* and *C. cupressoides*, respectively. Therefore, anticoagulant SP isolated from chlorophyceae showed effects inferior to heparin, and comparative studies of these molecules are also suggested as auxiliary tools in the identification of algae of the same genus.

Key words: green algae, sulfated macromolecules, blood coagulation, APTT.

Introdução

As algas constituem um diversificado grupo de organismos autotróficos que podem ser encontrados em ambientes aquáticos e terrestres úmidos (SZE, 1997), respondendo assim a inúmeras variáveis ambientais (CAVATI; FERNANDEZ, 2008). A

síntese de compostos, conhecidos como polissacarídeos sulfatados (PS), tem gerado grande interesse na biotecnologia de produtos naturais, tendo em vista as suas propriedades geleificantes, espessantes e estabilizantes de misturas aquosas e emulsões na indústria de alimentos (GLICKSMAN,

1983), na bioprospecção de novos agentes farmacológicos (FONSECA et al., 2008) e na prevenção do estresse no cultivo de organismos aquáticos (CHOTIGEAT et al., 2004; BARROSO et al., 2007). Encontrados em grandes concentrações nas algas marinhas, vários aspectos, quanto à estrutura e ao metabolismo de polissacarídeos de algas, são relatados em revisões específicas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967).

A atividade anticoagulante é uma das propriedades biológicas mais estudadas de PS, expressando-se nos mais diferentes organismos aquáticos, incluindo as algas (FARIAS et al., 2000; MATSUBARA et al., 2001; MOURÃO, 2004; PEREIRA et al., 2005; ATHUKORALA et al., 2006; ATHUKORALA et al., 2007; ZHANG et al., 2008), os vertebrados (SOUZA et al., 2007) e os invertebrados (MOURÃO; PEREIRA, 1999).

O aumento das doenças cardiovasculares está intimamente relacionado à trombose, levando, na grande maioria dos casos, a óbitos ou à invalidez parcial ou total, causando graves repercussões ao paciente, a sua família e à sociedade. O sedentarismo, hábitos alimentares e o estresse são considerados riscos em potenciais na promoção de tais doenças (NADER et al., 2001). A necessidade de se explorar novas biomoléculas com propriedades anticoagulantes também é justificada pelos efeitos adversos da heparina (extraída de boi e porco), tais como plaquetopenia, hemorragia e risco viral. A heparina é mundialmente utilizada como agente terapêutico (anticoagulante e antitrombótico) na prevenção e no tratamento de pacientes acometidos por trombose venosa e arterial, causada por diferentes etiologias (WEIZT, 1994) e para motivar várias pesquisas, utilizando organismos marinhos na busca por novos heparinóides (MOURÃO; PEREIRA, 1999).

As algas representam um grupo heterogêneo de organismos encontrados abundantemente em muitos os ecossistemas e estudos comparativos de PS isolados de espécies marinhas pertencentes ao mesmo gênero sugerem como ferramentas auxiliares na identificação destes organismos, auxiliando nos critérios clássicos de sistemática e taxonomia de algas (RODRIGUES; FARIAS, 2009).

Neste contexto, a diversidade da flora marinha brasileira favorece a descoberta de agentes farmacológicos na prevenção e no tratamento de doenças relacionadas à trombose (FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; FONSECA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009). De forma a contribuir com a descoberta de novos agentes anticoagulantes, duas espécies de algas marinhas verdes do gênero

Caulerpa foram investigadas pelo emprego de técnicas de bioquímica comparativa, contribuindo também para a caracterização desses compostos de algas pertencentes ao mesmo gênero.

Material e métodos

Coleta e extração dos polissacarídeos sulfatados totais

Exemplares de *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh e *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh (CAULERPALES; CHLOROPHYTA) foram coletados na praia do Pacheco-Caucaia-Ceará em agosto/2007 e conduzidos em sacos plásticos ao Laboratório de Carboidratos e Lectinas (Carbolec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Estado do Ceará. Em laboratório, o material foi lavado com água destilada e separado de epífitas e/ou organismos incrustantes, permanecendo estocado (-20°C) até a extração dos polissacarídeos.

A extração dos PS totais (PST) foi realizada segundo Farias et al. (2000), com algumas modificações. Inicialmente, a alga, desidratada em temperatura ambiente (25°C) e macerada com N₂ 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⁻¹) para extração dos PST em banho-maria (MARCONI, modelo MA 159) durante 6h a 60°C. Após este 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 24h 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⁻¹) e novamente precipitado por meio da adição de 200 mL de etanol comercial (Santa Cruz) (24h; 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.

Purificação por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose

Os PST (30 mg), dissolvidos em tampão AcNa 0,05 M (2 mg mL⁻¹), foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose (12 × 1,5 cm) (Sigma Chemical) equilibrada e percolada com tampão AcNa 0,05 M até a completa remoção dos polissacarídeos não-retidos, seguida do fracionamento dos PS por eluição (stepwise) com o mesmo tampão de

equilíbrio, contendo NaCl em diferentes concentrações (0,50; 0,75 e 1,00 M), utilizando-se um coletor de frações (FRAC-920) com fluxo ajustado (60 mL h⁻¹). As frações de PS (3,0 mL) foram monitoradas por meio da propriedade metacromática, usando-se o azul de 1,9-dimetilmetileno (ADM), segundo Farndale et al. (1986), em espectrofotômetro (AMERSHAM BIOSCIENCES ULTROSPEC 1100) ajustado a 525 nm, e, em seguida, as frações metacromáticas foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e concentradas por liofilização para os ensaios posteriores.

Eletroforese em gel de agarose

Os PST e as frações de PS (25 µg) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão 1,3 - acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0) (Aldrich). Os PS foram aplicados no gel e a corrida foi realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após a corrida, as amostras presentes no gel foram fixadas com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio 0,1% (Vetec Química) por 24h. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina 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 e Dietrich (1976). Pela inexistência de padrões para algas, glicosaminoglicanos de animais (condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparim sulfato (HS) e heparina (HEP)) foram utilizados para a caracterização dos PS obtidos das algas quanto aos padrões e às densidades de cargas.

Análises químicas

O conteúdo de carboidrato total (CT) das frações foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956) em placa (MASUKO et al., 2005), utilizando-se a D-galactose para a obtenção da curva-padrão em leitor de Elisa (AMERSHAM BIOSCIENCES, modelo BIOTRAK II). O conteúdo de proteínas contaminantes (PC) foi estimado pelo método descrito por Bradford (1976), usando-se albumina sérica bovina como padrão. O teor de sulfato livre (SL) foi determinado pelo método gelatina-bário descrito por Dodgson e Price (1962), usando-se sulfato de sódio para a obtenção da curva-padrão.

Ensaios anticoagulantes

A avaliação da atividade anticoagulante foi realizada por meio do teste do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), segundo especificações do fabricante. Inicialmente, o sangue

citratado de humano normal (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 se 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 (UI) por mg de polissacarídeo, utilizando-se a HEP (193 UI mg⁻¹) como curva-padrão.

Resultados e discussão

Rendimento

O emprego da metodologia que utiliza a digestão enzimática de proteínas por enzimas proteolíticas (papaína) na extração dos PST resultou em rendimentos semelhantes entre as espécies. A maior quantidade de PST foi obtida em *C. racemosa* (4,10%), enquanto na espécie *C. cupressoides* resultou em, no máximo, 3,17% de rendimento total, a partir de tecido macerado da alga desidratado.

O rendimento destes compostos pode variar com a utilização de diferentes espécies, metodologias empregadas e condições de extração. O emprego de enzimas proteolíticas (papaína) na extração de PST das algas marinhas *Botryocladia occidentalis* (4,00%) (rodofícea) por Farias et al. (2000) e o da clorofícea *Caulerpa sertularioides* (3,30%), segundo Bezerra-Neto et al. (2008), resultaram em rendimentos semelhantes aos da *C. racemosa* e da *C. cupressoides*, respectivamente. A utilização do método resultou em rendimento inferior na espécie *Gelidium crinale* (2,60%) (PEREIRA et al., 2005), mas superior em *Halymenia pseudofloresia* (RODRIGUES et al., 2009), cujo valor foi 40,00%. A extração aquosa do alginato (polissacarídeo não-sulfatado) da alga marinha parda de *Sargassum vulgare* (16,90%) (TORRES et al., 2007) apresentou rendimento de PST intermediário quando comparada à feofíceia *Sargassum polycystum* (22,30%) (CHOTIGEAT et al., 2004), esta última utilizando HCl como meio extrator dos polissacarídeos totais.

Segundo Bird (1988), a biossíntese de PS também pode sofrer variação mediante as condições climáticas ambientais. Percival e McDowell (1967), por outro lado, relatam que o emprego de extrações sequenciais resulta na otimização do rendimento de

PS de algas. Rodrigues et al. (2009), realizando três extrações consecutivas do PST da rodofíceia *H. pseudofloresia* por 24h, em presença de papaína, obtiveram rendimento de 47,14%. O emprego de extrações consecutivas sugere a obtenção de PS distintos e alocados em diferentes camadas do tecido algal (RODRIGUES; FARIAS, 2009) podendo ser considerado uma técnica importante na obtenção de PS com propriedades geleificantes e espessantes de grande valor para a indústria alimentícia (GLICKSMAN, 1983) e de novos agentes farmacológicos (BEZERRA-NETO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009). Portanto, a realização de extrações sequenciais, utilizando as espécies *C. racemosa* e *C. cupressoides*, sugere posteriores estudos de maneira a tornar ótimo o rendimento.

Purificação por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose

Os perfis cromatográficos obtidos em coluna de troca iônica (DEAE-celulose) indicaram a separação de três diferentes frações de PS (F I; F II e F III), eluídas nas concentrações 0,50; 0,75 e 1,00 M de NaCl, respectivamente (Figura 1). O maior rendimento das frações foi obtido na F II, eluída com 0,75 M de NaCl, em relação às demais observadas nos táxons (Tabela 1).

O emprego de procedimentos cromatográficos, utilizando a matriz trocadora aniônica DEAE-celulose, tem sido eficiente na separação de frações de PS em várias espécies de algas marinhas (FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; BEZERRA-NETO et al., 2008). Rodrigues e Farias (2009) isolaram frações oriundas de três extrações consecutivas de PST da rodofíceia *H. pseudofloresia*, reportando diferenças marcantes entre os perfis cromatográficos dos PS isolados. A eficiência de separação se traduz em vantagens, tendo em vista o elevado grau de complexidade e heterogeneidade destes compostos presentes nas diferentes espécies de algas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967), dificultando a sua caracterização estrutural (FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; ZHANG et al., 2008).

Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose revelou diferenças entre o grau de purificação das frações e o PST, bem como no padrão de cargas das frações de PS obtidas de ambas as espécies (Figura 2). As frações F I e F II de *C. racemosa* (Cr) apresentaram um padrão de cargas diferentes entre si (Figura 2A) e densidades maiores quando comparadas aos padrões

de glicosaminoglicanos e a espécie *C. cupressoides* - Cc (Figura 2C), distintas resoluções no gel. A F III (*C. racemosa*); F I e F III (*C. cupressoides*) não foram observadas (Figuras 2A e 2B). Quando a fração purificada F II - Cr (*C. racemosa*) foi comparada à *C. cupressoides* (F II - Cc), foi observado um distinto padrão eletroforético (Figura 2C). A menor mobilidade de F II - Cr sugere que a espécie apresenta PS com maior presença de grupamentos sulfatos em relação à F II - Cc. Tais características podem ser atribuídas em razão da heterogeneidade estrutural destes compostos entre diferentes espécies (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; RODRIGUES; FARIAS, 2009).

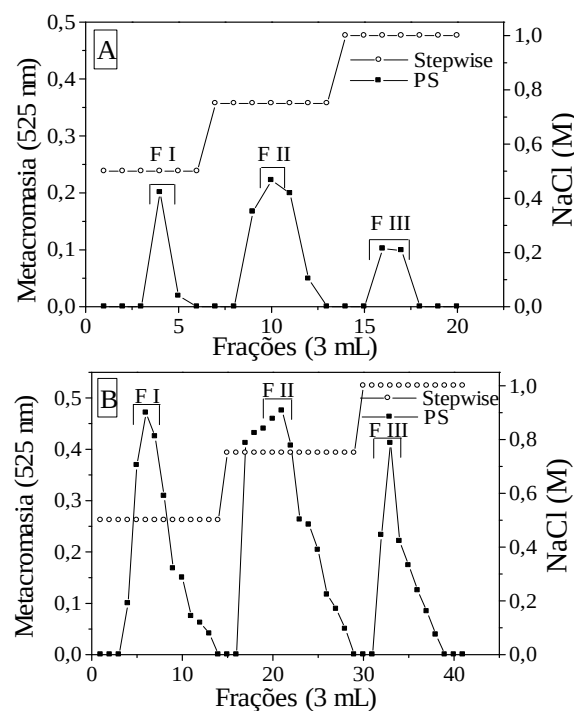


Figura 1. Cromatogramas dos extratos totais de *C. racemosa* (A) e *C. cupressoides* (B) em coluna de troca iônica (DEAE-celulose). A coluna foi equilibrada e lavada com tampão AcNa 0,05 M. Os PS, adsorvidos no gel, foram eluídos com mesmo tampão, contendo NaCl em diferentes concentrações (0,50; 0,75 e 1,00 e M). Os PS foram monitorados por meio da propriedade metacromática com azul-dimetilmetileno a 525 nm. (■—■); polissacarídeos sulfatados (PS); (○—○) e gradiente salino (stepwise).

Rodrigues e Farias (2009), utilizando técnicas da bioquímica comparativa na investigação de PST extraídos de rodofíceas do gênero *Halymenia*, observaram diferenças marcantes quando galactanas sulfatadas, a forma de PS presente em algas vermelhas, (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; RODRIGUES; FARIAS, 2009; RODRIGUES

et al., 2009), foram submetidas a colunas de separação por DEAE-celulose e eletroforese em gel de agarose, sugerindo o emprego desta técnica como mais uma estratégia importante na identificação taxonômica desses organismos.

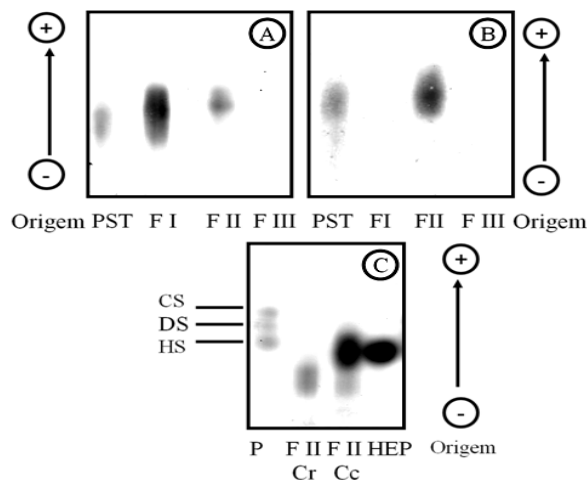


Figura 2. Revelação das frações de polissacarídeos sulfatados das algas marinhas verdes *C. racemosa* (A) e *C. cupressoides* (B) por eletroforese em gel de agarose a 0,5% e quando comparadas à heparina (HEP) não-fracionada (C). Os PST, as frações (F I; F II e F III) e os padrões (P) de glicosaminoglicanos condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (HS) e HEP, presentes no gel, foram corados com azul de toluidina a 0,1%.

Neste trabalho, a utilização deste método para as clorofíceas *C. racemosa* e *C. cupressoides* também revelou diferenças quando estes compostos foram comparados entre si, realizando-se apenas uma única extração (Figura 2). Segundo Teixeira (2002), o estudo de macromoléculas envolvidas no metabolismo de organismos marinhos sugere correlacionar detalhes quanto ao seu uso como marcadores moleculares taxonômicos, filogenéticos e biogeográficos.

Análises químicas

A composição química das frações separadas em DEAE-celulose, quando submetidas ao gradiente salino, também revelou diferenças entre as espécies (Tabela 1). O conteúdo de CT das frações isoladas (F I; F II e F III) foi semelhante em *C. racemosa*, enquanto menores teores (F I e F III) foram encontrados para *C. cupressoides*. A fração F II de *C. racemosa* apresentou maior teor de SL (23,98%) quando comparada à *C. cupressoides* (19,20%), reforçando, assim, as observações da Figura 2C. Também não foram mensuradas proteínas solúveis, denotando-se a eficiência do método na digestão enzimática de proteínas pela papaína durante a extração dos PST presentes em *C. racemosa* e *C. cupressoides*.

Tabela 1. Rendimento e composição química das frações das algas marinhas verdes *C. racemosa* e *C. cupressoides*.

Espécies	Frações	Rendimento (%)	Composição química (%)	
			CT*	PC
<i>C. racemosa</i>	F I	9,36	26,50	-
	F II	18,57	25,40	-
	F III	3,00	27,26	-
<i>C. cupressoides</i>	F I	16,36	15,89	-
	F II	23,33	29,71	-
	F III	3,64	9,65	-

* Resultados da média de três determinações; - Não-detectado.

Percival e McDowell (1967) reportam que algumas separações de polissacarídeos em algas podem ser realizadas mediante a extração diferencial, utilizando-se diferentes solventes tais como a extração aquosa (fria e/ou quente) e a alcalina (fria e/ou quente), rendendo frações com propriedades e composições químicas diferentes. Além disto, polissacarídeos de cada espécie de alga possuem suas características próprias e dificuldades durante os procedimentos de separação e purificação em razão da complexidade e heterogeneidade dessas macromoléculas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; FARIAS et al., 2000; PEREIRA et al., 2005; RODRIGUES; FARIAS, 2009; RODRIGUES et al., 2009).

Atividade anticoagulante

Os ensaios anticoagulantes, realizados segundo o teste do TTPA, revelaram frações de PS capazes de modificar o tempo normal de coagulação (Tabela 2). A concentração mínima de PS para prolongar o TTPA foi de 0,10 mg mL⁻¹ nas frações F II, eluídas com 0,75 M de NaCl, em ambas as espécies (*C. racemosa* - Cr e *C. cupressoides* - Cc), cujas atividades foram de 21,23 e 24,36 UI mg⁻¹, respectivamente. As menores atividades foram observadas nas frações eluídas com 0,50 e 1,00 M de NaCl (*C. racemosa*), enquanto nas frações de PS, separadas nas mesmas eluições (F I e F III) de *C. cupressoides*, a atividade não foi detectada a uma elevada concentração de PS (1,00 mg mL⁻¹). Desta forma, as atividades anticoagulantes das duas espécies verdes testadas foram bastante inferiores à HEP não-fracionada.

A ação dos PS de *C. racemosa* e *C. cupressoides*, na coagulação sanguínea, normalmente promoveu a inibição da via intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação, quando mensurados pelo teste do TTPA (Tabela 2), enquanto o teste de protrombina (dados não-apresentados) não indicou prolongamentos no tempo de coagulação nas diferentes concentrações de PS testadas, sugerindo que estes compostos não atuam na inibição da via extrínseca da cascata de coagulação (ATHUKORALA et al., 2006;

ATHUKORALA et al., 2007; ZHANG et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009).

Tabela 2. Atividade anticoagulante das frações polissacarídicas obtidas por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) de *C. racemosa* e *C. cupressoides* em relação à HEP.

Espécie	Fração	Eluição (NaCl)	Teste do TTPA *						UI mg ⁻¹
			1,00 **	0,75 **	0,50 **	0,25 **	0,10 **	UI mg ⁻¹	
			mg mL ⁻¹	mg mL ⁻¹	mg mL ⁻¹	mg mL ⁻¹	mg mL ⁻¹	mg mL ⁻¹	***
Cr	F I	0,50 M	88,47 s	68,33 s	55,00 s	-	-	-	7,01
	F II	0,75 M	181,97 s	90,29 s	73,20 s	52,85 s	45,85 s	-	21,23
	F III	1,00 M	57,90 s	43,15 s	34,40 s	-	-	-	4,04
Cc	F I	0,50 M	-	-	-	-	-	-	-
	F II	0,75 M	203,00 s	103,65 s	84,35 s	59,50 s	45,45 s	-	24,36
	F III	1,00 M	-	-	-	-	-	-	-

*TTPA em segundos; **Concentração de PS para prolongar o TTPA; ***Atividade expressa em unidades internacionais (UI) por mg de PS; - Sem-atividade; HEP (193,00 UI mg⁻¹; 0,01 mg mL⁻¹; TTPA: 40,15 s); Plasma: 33,0 s.

Diferentes mecanismos anticoagulantes têm sido reportados para os PS isolados de algas. Farias et al. (2000) observaram acentuada atividade anticoagulante de uma D-galactana sulfatada extraída da alga marinha vermelha *B. occidentalis*. A atividade foi mediada pela inibição da trombina via antitrombina e cofator II da heparina (reguladores plasmáticos da coagulação sanguínea) pela presença de dois ésteres de sulfato em um único resíduo de galactose. Matsubara et al. (2001) relataram que o polissacarídeo isolado da alga marinha verde *Codium cylindricum* possui um mecanismo inibitório direto sobre a trombina independente da antitrombina e do cofactor II da heparina. Recentemente, Fonseca et al. (2008) reportaram 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 sulfatos na estrutura química e seus mecanismos distintos 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 destes 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 por outras doenças com deficiências de fatores de coagulação.

As diferenças nas atividades anticoagulantes das frações entre as espécies, no geral, reforçam os diferentes comportamentos desses compostos, quando observadas por eletroforese (Figura 2 e Tabela 2). As maiores atividades foram verificadas para dependentes das frações que apresentaram as maiores definições e densidade de cargas no gel (Figura 2), principalmente em relação à espécie *C. cupressoides*, a qual apresentou atividade somente para

F II (24,36 UI mg⁻¹), mas não para F I e F III, não sendo estas últimas observadas no perfil eletroforético (Figura 2B). Tais diferenças na atividade das frações de *C. racemosa* e *C. cupressoides* também vêm justificar as características destas moléculas já reportadas por eletroforese (Figura 2). Entretanto, a ação dos PS na coagulação não ocorre meramente como uma função de densidade de cargas, mas também de composição monossacarídica, posição de grupos sulfatos e principalmente na ocorrência de unidades dessulfatadas (MOURÃO, 2004). Desta forma, as características químicas também são pré-requisitos para correlacionar as funções biológicas com as estruturas desses compostos (MOURÃO; PEREIRA, 1999; FONSECA et al., 2008; ZHANG et al., 2008).

Os PS isolados das clorofíceas *C. racemosa* e *C. cupressoides* apresentaram baixo potencial anticoagulante. No entanto, a heterogeneidade destes compostos nas mais diferentes espécies de algas pode promover interações particulares. Deste modo, o uso destes polissacarídeos em outros processos biotecnológicos sempre gera expectativas para a realização de diferentes ensaios biológicos (MOURÃO; PEREIRA, 1999; CHOTIGEAT et al., 2004; BARROSO et al., 2007; FONSECA et al., 2008). Mourão e Pereira (1999) enfatizam que não basta apenas comparar uma requerida dose para uma ação antitrombótica, mas também que a persistência do efeito, os níveis de circulação no plasma, a correlação entre a ação anticoagulante e antitrombótica, a disponibilidade e absorção quando a droga é administrada em diferentes rotas, e os modelos de experimentação animal são ferramentas importantes no estudo de diferentes polissacarídeos no desenvolvimento de novas drogas, despertando, assim, o interesse para posteriores estudos por nosso grupo de pesquisa.

Conclusão

Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* apresentaram baixo potencial anticoagulante. No entanto, a avaliação comparativa destes compostos quanto à identificação de espécies sugere uma ferramenta auxiliar na taxonomia de algas. Um estudo com maior número de espécies do gênero também seria indicado.

Agradecimentos

Ao Programa Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq), a Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (Funcap), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e ao Ministério da Saúde (MS).

Referências

- 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.
- ATHUKORALA, Y.; LEE, K. W.; KIM, S. K.; JEON, Y. J. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1711-1716, 2007.
- BARROSO, F. E. C.; RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Efeito do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* nas pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 1, p. 58-63, 2007.
- 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.
- BIRD, K. T. Agar production and quality from *Gracilaria* sp. strain G-16: effects of environmental factors. **Botanica Marina**, v. 31, n. 2, p. 33-39, 1988.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CAVATI, B.; FERNANDEZ, V. O. Algas perifíticas em dois ambientes do baixo rio Doce (lagoa Juparanã e rio Pequeno – Linhagens, Estado do Espírito Santo, Brasil: variação espacial e temporal. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, n. 4, p. 439-448, 2008.
- CHOTIGEAT, W.; TONGSUPA, S.; SUPAMATAYA, K.; PHONGDARA, A. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, v. 233, n. 1-4, p. 23-30, 2004.
- 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.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulfato content of sulfated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, n. 1, p. 106-110, 1962.
- 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.; 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.
- MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S. I.; LEE, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69-72, 2005.
- MATSUBARA, K.; MATSUBARA, Y.; BASIC, A.; LIAO, M. L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, n. 5, p. 395-399, 2001.
- MOURÃO, A. P. S. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 9, p. 967-981, 2004.
- MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends 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, I. L. 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.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. New York: Academic Press, 1967.
- 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.
- RODRIGUES, J. A. G.; FARIAS, W. R. L. Avaliação comparativa dos polissacarídeos sulfatados extraídos de rodofíceas do gênero *Halymenia* spp. Ferramenta taxonômica para algas? **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 4, n. 1, p. 7-20, 2009.
- 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, 2009.

SOUZA, M. L. S.; DELLIAS, J. M. M.; MELO, F. R. M.; SILVA, L. C. Structural composition and anticoagulant activity of dermatan sulfate from the skin of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L). **Comparative Biochemistry and Physiology. Parte B. Biochemistry and Molecular Biology**, v. 147, n. 3, p. 387-394, 2007.

SZE, P. **A biology to the algae**. New York: McGraw-Hill, 1997.

TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais marinhos. In: PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. (Ed.). **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002, p. 249-279.

TORRES, M. R.; SOUSA, A. P. A.; FILHO, E. A. T. S.; MELO, D. F.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M.; LIMA, M. G. S. Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil. **Carbohydrate**

Research, v. 342, n. 14, p. 2067-2074, 2007.

WEITZ, J. New anticoagulant strategies. Current status and future potentials. **Drugs**, v. 48, n. 1, p. 485-497, 1994.

ZHANG, H. J.; MAO, W. J.; FANG, F.; LI, H. Y.; SUN, H. H.; CHEN, Y.; QI, X. H. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 3, p. 428-434, 2008.

Received on December 3, 2008.

Accepted on March 2, 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.