



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

EDUARDO HENRIQUE CUNHA DE FARIAS

**HOMOGALACTANAS SULFATADAS DA ALGA *Codium
isthmocladum* COM ATIVIDADE ANTICOAGULANTE**

**NATAL
2006**

EDUARDO HENRIQUE CUNHA DE FARIAS

**HOMOGALACTANAS SULFATADAS DA ALGA *Codium
isthmocladum* COM ATIVIDADE ANTICOAGULANTE**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

**NATAL
2006**

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Farias, Eduardo Henrique Cunha de.

Homogalactanas sulfatadas da alga *Codium isthmocladum* com atividade anticoagulante / Eduardo Henrique Cunha de Farias. – Natal, RN, 2006.

74 f. : il.

Orientador : Hugo Alexandre de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

1. Alga (*Codium isthmocladum*) - Dissertação. 2. Atividade anticoagulante – Dissertação. 3. Galactanas sulfatadas – Dissertação. I. Rocha, Hugo Alexandre de Oliveira. II. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 582.26(043.3)

Dedico esta obra

À minha mãe Lélia, por ser durante todos esses anos a mulher da minha vida, a qual sou apaixonado não tão somente por sua beleza externa, mas por uma beleza interior que jamais vi em outra pessoa e por ter me dado, além da melhor educação possível, um bem muito mais valioso: o seu amor.

Dedico esta obra

A Roberta, por todos esses anos de amor, carinho e respeito e também de desavenças, mas que de tão poucas, e sabemos disso, se perdem facilmente nesse mar de maravilhosos e inesquecíveis momentos, o que mais poderia falar sobre uma pessoa tão especial, prefiro apenas agradecer por ter a conhecido e principalmente por ter sido escolhido como seu noivo, futuro marido e pai dos seus filhos.

Dedico esta obra

A Hugo, uma pessoa com a qual aprendi não só a conviver, entender e respeitar, mas principalmente a admirar, a ponto de trazê-lo para meu convívio pessoal, para que não fosse mais apenas um mestre, um orientador, e sim um irmão, um amigo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua existência.

A meus pais, Lélia e Mário, por sempre estarem presentes e compartilharem comigo todos os momentos, desde os mais difíceis aos mais fáceis de minha vida.

A todos os meus familiares, que fazem da convivência familiar a melhor coisa da minha vida, em especial a minha vovó Guacyra, que me mostrou o quanto é bonito a Biologia e dentro desta a Bioquímica em especial, e me guiou, mais do que qualquer pessoa, para que eu alcançasse esse objetivo.

A minha noiva e eterno amor Roberta, pelo carinho que a mim sempre foi dado e principalmente pela força, ajuda e paciência nesses últimos momentos juntos.

Aos amigos de departamento, muito obrigado, poderia citar um por um, pois todos sempre me proporcionaram bons momentos na minha vivência na bioquímica, a Tarciana pela grande ajuda na construção deste trabalho, a Adeliana pela companhia nos finais de semana e acima de tudo pelo exemplo de dedicação, e em especial a minha Cybelle (meu protocolo ambulante) que sempre foi meu porto seguro desde de quando entramos no departamento e trabalhávamos juntos até os dias de hoje.

Aos amigos do BIOPOL, Ivan, Leandro, Ana, Mariana, Nednaldo, Popó, Edjane, pela convivência, amizade e participação direta neste trabalho, aos novos alunos que estão entrando agora no laboratório que nem sei o nome direito de todos e em especial a Sara por todo carinho a mim dado nestes anos.

A professora Edda, por ter me recebido em seu laboratório e por ter estado sempre a disposição em tudo que precisei.

Ao professor e meu orientador Hugo, pela confiança, credibilidade e paciência para a conclusão desse trabalho e, principalmente, por sua amizade durante esses anos.

Aos professores do Departamento, pelo ótimo convívio e pelos conhecimentos passados, principalmente a professora Jacyra por sua companhia no laboratório em diversos momentos e ao professor Maurício, que apesar de todas as broncas a mim direcionadas, sei que tem um coração enorme e sempre guardou por mim um carinho especial.

Aos amigos da turma de mestrado, por todo tempo maravilhoso de convivência não só dentro da sala de aula, mas principalmente fora dela.

Aos amigos da vida, desde os mais recentes aos mais antigos, dos que passaram e os que ainda convivo, que, com certeza, tiveram ou tem alguma contribuição neste passo importante da minha vida.

E a todos que por um acaso tenham ficado fora dessa lista, que se sintam agradecidos da mesma forma, pois quem me conhece sabe da minha péssima memória.

*Emancipate yourself from mental slavery,
None but ourselves can free our minds*
Bob Marley

RESUMO

Desde a primeira descrição de polissacarídeos sulfatados em algas marinhas, as atividades biológicas destes compostos foram avaliadas sob diferentes aspectos e procedimentos experimentais. Dentre as diversas atividades biológicas apresentadas pelos polissacarídeos de algas marinhas, a ação do anticoagulante aparece como sendo uma função promissora. Neste presente estudo foram obtidas cinco frações de polissacarídeos sulfatados da alga *Codium isthmocladum* (F0.3, F0.5, F0.7, F0.9 e F1.2), através de proteólise seguida de fracionamento com volumes crescentes de acetona. Análises químicas demonstraram que todas as frações são compostas por polissacarídeos sulfatados. A atividade anticoagulante destas frações cetônicas foram determinadas por testes de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e tempo de protrombina (PT), utilizando plasma humano normal citratado. Nenhuma fração apresentou atividade via teste de PT. No entanto todas as frações demonstraram atividade anticoagulante para teste de aPPT. Estes resultados indicam que o(s) seu(s) alvo(s) molecular(es) esta(ão) localizado(s) principalmente na via intrínseca da cascata de coagulação. Eletroforese em gel de agarose demonstrou a presença de 2 ou 3 bandas em varias frações cetônicas, enquanto a F0.9, somente uma banda. Os polissacarídeos da F 0.9, quando submetidos a cromatografia da troca iônica, foram separados em duas novas frações eluídas com 2,0 e 3,0 M de NaCl. Estes compostos apresentaram um peso molecular de 6.4 e 7.4 kDa respectivamente. Análises químicas e espectroscopia de infravermelho das Gal 1 e Gal 2 demonstraram que essas são homogalactanas sulfatadas e que diferenciavam uma da outra apenas no grau e localização dos grupamentos sulfato. Teste de aPTT mostrou que as frações 2,0 e 3,0 M (Gal 1 e Gal 2, respectivamente) possuem atividade anticoagulante. Esta é a primeira vez que homogalactanas sulfatadas anticoagulantes são extraídas de macroalgas verdes. A massa necessária de Gal 1 (6,3µg) para prolongar o tempo normal de coagulação em duas vezes, via teste de aPTT, foi semelhante a Clexane®, no entanto somente 0,7µg da Gal 2 são necessários para se obter o mesmo efeito. A Gal 2 em altas doses (250µg) induziu a agregação plaquetária. Estes resultados sugerem que as galactanas da alga *C. isthmocladum* tem potencial aplicação como fármacos anticoagulantes

Palavras-chave: *Codium isthmocladum*. Atividade anticoagulante. Galactanas sulfatadas

ABSTRACT

Since the first description of sulfated polysaccharides from seaweeds, the biological activities of these compounds have been evaluated under different aspects and experimental procedures. Among the broad biological activities presented by seaweed polysaccharides, anticoagulant action appears as a promising function. In this present study we have obtained sulfated polysaccharides from the green seaweed *Codium isthmocladum* by proteolytic digestion, followed by separation into five fractions (0.3, 0.5, 0.7, 0.9 and 1.2) by sequential acetone precipitation. The chemical analyses have demonstrated that all fractions are composed mainly by sulfated polysaccharides. The anticoagulant activity of these fractions was determined by activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time test (PT) using citrate normal human plasma. None fraction has shown anticoagulant activity by PT test. Furthermore, all of them have shown anticoagulant activity by aPTT test. These results indicated that the molecular targets of these sulfated polysaccharides are mainly in the intrinsic via of the coagulation cascade. Agarose gel electrophoresis in 1,3-diaminopropane acetate buffer, pH 9.0, stained with 0.1% toluidine blue showed the presence of two or three bands in several fractions while the fraction 0.9 showed a single spot. By anion exchange chromatography, the acid polysaccharides from the 0.9 acetone fraction were separated into two new fractions eluted respectively with 2.0 and 3.0 M NaCl. These compounds showed a molecular weight of 6.4 and 7.4 kDa respectively. Chemical analyses and infrared spectroscopy showed that Gal 1 and Gal 2 are sulfated homogalactans and differ one from the other in degree and localization of sulfate groups. aPPT test demonstrated that fractions 2,0 and 3,0M (Gal1 and Gal 2, respectively) have anticoagulant activity. This is the first time that anticoagulant sulfated homogalactans have been isolated from green algae. To prolong the coagulation time to double the baseline value in the aPTT, the required amount of sulfated galactan 1 (6,3 μ g) was similar to low molecular heparin Clexane®, whereas only 0,7 μ g of sulfated galactan 2 was needed to obtain the same effect. Sulfated galactan 2 in high doses (250 μ g) induces platelet aggregation. These results suggest that these galactans from *C. isthmocladum* have a potential application as an anticoagulant drug.

Key-words: *Codium isthmocladum*. Anticoagulant activity. Sulfated galactans

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Modelo clássico da cascata de coagulação	20
Figura 02	Novo modelo fisiológico da cascata de coagulação.....	22
Figura 03	Alga marinha verde <i>Codium isthmocladum</i> utilizada neste trabalho.....	29
Figura 04	Esquema de obtenção das frações cetônicas de polissacarídeos da alga <i>C. isthmocladum</i>	34
Figura 05	Rendimento percentual das frações obtidas por precipitação com acetona, da alga marinha <i>Codium isthmocladum</i>	42
Figura 06	Cromatografia descendente em papel dos hidrolisados das frações cetônicas da alga <i>C. isthmocladum</i>	44
Figura 07	Comportamento eletroforético das frações cetônicas da alga <i>Codium isthmocladum</i>	47
Figura 08	Comportamento eletroforético das Gal 1 e Gal 2, resultantes da cromatografia de troca iônica da F 0.9 da alga <i>Codium isthmocladum</i>	50
Figura 09	Eletroforese em gel de poliacrilamida das Gal 1 e Gal 2.....	51
Figura 10	Cromatografia descendente em papel dos hidrolisados das Gal 1 e Gal 2 extraídas da alga <i>C. isthmocladum</i>	54
Figura 11	Espectros de infravermelho da região entre 1000 – 800 cm ⁻¹ das Gal 1 e Gal 2.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Análises químicas e relações molares dos açúcares e do sulfato presentes nas frações cetônicas da alga <i>Codium isthmocladum</i>	46
Tabela II	Atividade anticoagulante das frações cetônicas da alga <i>Codium isthmocladum</i>	48
Tabela III	Análises químicas e relações molares dos açúcares presentes nas Gal 1 e Gal 2.....	53
Tabela IV	Atividade anticoagulante da F 0.9, Gal 1, Gal 2 e heparinas.....	58
Tabela V	Efeito das Gal 1 e Gal 2 na agregação plaquetária.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

ÁC. GLU	Ácido glucurônico
ADP	Adenosina di-fosfato
aPTT	Tempo de tromboplastina parcial ativada
ARA	Arabinose
AT	Antitrombina
C-2	Carbono 2
C-3	Carbono 3
C-4	Carbono 4
C-6	Carbono 6
CAPM	Cininogênio de alto peso molecular
CETAVLON	Brometo de cetiltrimetilamônio
CS	Condroitim sulfato
DS	Dermatam sulfato
F 0.3	Fração precipitada com 0,3 volumes de acetona
F 0.5	Fração precipitada com 0,5 volumes de acetona
F 0.7	Fração precipitada com 0,7 volumes de acetona
F 0.9	Fração precipitada com 0,9 volumes de acetona
F 1.2	Fração precipitada com 1,2 volumes de acetona
FII	Protombina
FIX	Fator Christmas
FUC	Fucose
FV	Pró-acerelina

FVII	Pró-convertina
FVIII	Anti-hemofílico
FX	Fator de Stuart
FXI	Antecedente de tromboplastina
FXII	Fator de Hageman
GAL	Galactose
Gal 1	Galactana 1
Gal 2	Galactana 2
HCII	Cofator II da heparina
HEP	Heparina
HS	Heparam sulfato
LMWH	Heparina de baixo peso molecular
MAN	Manose
PK	Pré-caliceína
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
PT	Tempo de protombina
RHA	Rhamnose
RPM	Rotações por minuto
SO₃Na	Sulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metileno diamino
TF	Fator tecidual
v/v	Volume/volume
XIL	Xilose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1	MATERIAL BIOLÓGICO	29
2.2	OUTROS MATERIAIS	30
2.2.1	Reagentes	30
2.2.2	Padrões	31
2.2.3	Aparelhos	31
2.2.4	Plasma Humano	32
2.3	OBTENÇÃO DO “PÓ CETÔNICO”	32
2.4	OBTENÇÃO DO “CRU DE POLISSACARÍDEOS (PROTEÓLISE)	32
2.5	FRACIONAMENTO COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ACETONA	33
2.6	CROMATOGRAFIA	35
2.6.1	Cromatografia de troca iônica	35
2.6.2	Cromatografia em papel (sistema descendente)	35
2.7	ELETROFORESES	36
2.7.1	Eletroforese em gel de agarose	36
2.7.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida	37
2.8	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	38
2.9	ANÁLISES QUÍMICAS	38
2.9.1	Dosagem de açúcares totais	38
2.9.2	Dosagem de sulfato	38

2.9.3 Dosagem de proteínas	39
2.10 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE	39
2.11 AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	39
2.11.1 Preparação do plasma rico em plaqueta (PRP) e pobre em plaqueta (PPP)	39
2.11.2 Ensaio de agregação plaquetária	40
3 RESULTADOS	41
3.1 RENDIMENTO DAS FRAÇÕES CETÔNICAS DA ALGA CODUIM ISTHMOCLADUM	41
3.2 CROMATOGRAFIA EM PAPEL DESCENDENTE DAS FRAÇÕES CETÔNICAS	42
3.3 ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES CETÔNICAS	45
3.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DAS FRAÇÕES CETÔNICAS	46
3.5 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS FRAÇÕES CETÔNICAS	47
3.6 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA F 0.9	49
3.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DAS GAL 1 E GAL 2	50
3.8 ANÁLISES QUÍMICAS DAS GAL 1 E GAL 2 OBTIDAS POR TROCA IÔNICA	51
3.9 CROMATOGRAFIA EM PAPEL DESCENDENTE DAS GAL 1 E GAL 2	53
3.10 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	55

3.11	ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS GAL 1 E GAL 2	57
3.12	EFEITO DAS GAL 1 E GAL 2 NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	58
4	DISCUSSÃO	60
5	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	69

1 – INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são um grupo de enfermidades que acometem os seres humanos. Este grupo de doenças tem como principal característica o comprometimento do sistema circulatório, do qual fazem parte o coração e vasos sanguíneos. Enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC), a angina de peito estão entre as principais doenças cardiovasculares. Atualmente, as doenças cardiovasculares têm sido um grande problema a ser combatido no que diz respeito ao número de mortes causadas por estas (Fareed, 2000). Outro fator agravante é que, além de estar entre as maiores causas de morte no mundo, a quantidade de casos registrados vem aumentando ao longo dos anos (NVRs, 2003). A maioria destes casos origina-se da aterosclerose, uma condição na qual colesterol, gordura e tecido fibroso se depositam nas paredes das artérias de grande e médio calibre, que vão se obstruindo progressivamente, com maior ou menor velocidade e conseqüentemente menos sangue passa por estas artérias ocluídas. Não há uma causa única para as doenças cardiovasculares, mas sim, existem fatores que alteram o fluxo normal do sangue e aumentam a probabilidade de sua ocorrência. Pelo menos oito fatores de risco podem ajudar a prever uma doença cardiovascular: hereditariedade, idade avançada, diabetes, obesidade, sedentarismo, tabagismo, sexo e a hipertensão arterial sistêmica (Tavares, 2000; Simão, 2001).

A manutenção do fluxo sanguíneo normal na rede vascular é um mecanismo fisiológico complexo, decorrente da interação de diversos elementos: paredes vasculares, plaquetas e moléculas solúveis nas imediações de lesões traumáticas. Após uma lesão vascular, o sistema hemostático do indivíduo é ativado com o

objetivo de fechar a falha desse vaso. Diferentes processos estão envolvidos nesse sistema tais como vasoconstrição, agregação plaquetária, formação do coágulo, prevenção da propagação do coágulo e decomposição do coágulo (Ganong, 1973).

O mecanismo de coagulação implica numa série complexa de reações inter-relacionadas. A reação fundamental na coagulação do sangue é a conversão do fibrinogênio em fibrina e essas se polimerizam para formar um agregado denso e compacto: o coágulo. Essa reação de formação da fibrina é catalisada pela trombina, que por sua vez, foi obtida a partir da protrombina, através da ação do fator X ativado (fator Xa).

Porém, para facilitar o entendimento da ativação deste fator e dos mecanismos da cascata de coagulação, em meados dos anos 60, Macfarlane e Davie & Ratnoff propuseram a hipótese da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação do sangue. Essa hipótese foi denominada de modelo clássico do mecanismo de coagulação. Este modelo divide o mecanismo em duas vias: a extrínseca, onde há a necessidade de um elemento externo ao sangue para que essa via se processe e a intrínseca, onde os fatores necessários à coagulação já estão presentes no sangue circulante. A Figura 01 sumariza a seqüência de ativação proteolítica existente na cascata de coagulação (modelo clássico).

A via extrínseca é desencadeada pela formação do complexo Fator Tecidual (FT):Fator VIIa (FVIIa) que ativa o fator X. O fator tecidual (TF) é uma molécula transmembrana de células localizadas fora dos vasos sanguíneos, e é uma das principais moléculas responsáveis pela fase inicial da via extrínseca da cascata de coagulação. O fator tecidual é exposto na luz do vaso logo após uma injúria vascular, e possui uma alta afinidade com o fator VII que favorece a formação do complexo para ativação do fator X.

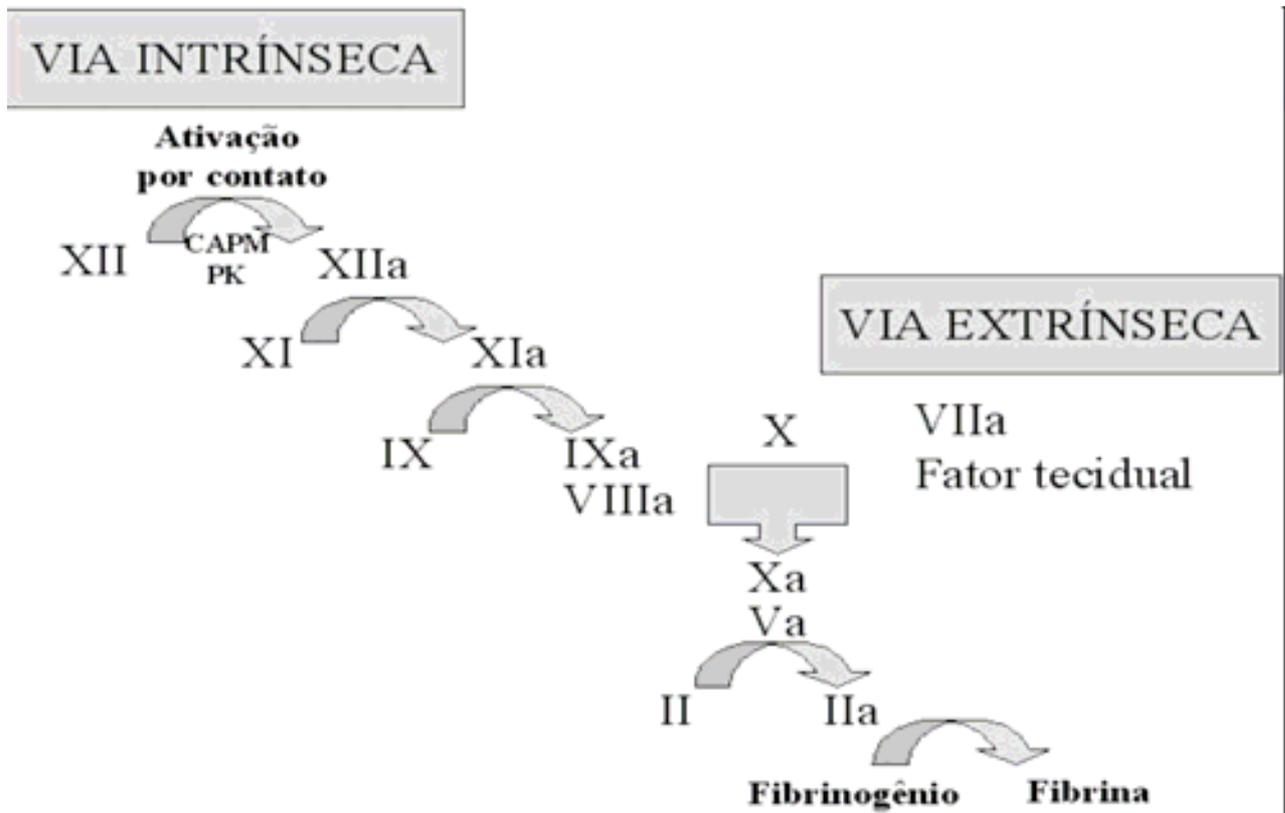


Figura 01. Modelo clássico da cascata de coagulação. Figura obtida de Franco, 2001.

A via intrínseca envolve somente componentes que estão presentes no meio intravascular. Ela é iniciada pela ativação do fator XII (FXII), quando este, entra em contato com o sangue e/ou qualquer superfície contendo cargas negativas, o que desencadeia uma série de ativação protéica ativando diretamente o fator X, o qual encontra-se na interseção das duas vias, formando uma única via denominada: via comum. Logo a ativação desse fator inicia a via comum, onde por fim se dará a formação do trombo. Para uma visão mais completa do assunto ver Franco, 2001.

Recentemente foi proposto um novo modelo da cascata de coagulação que envolve complexos pró-coagulantes de forma semelhantes da que ocorre no modelo

clássico. São relacionados três complexos enzimáticos pró-coagulantes que vão culminar na ativação da trombina: Complexo “tenase” extrínseco (fator tecidual (FT) + fator VIIa), complexo “tenase” intrínseco (fator IXa + fator VIIIa) e complexo “protrombinase” (fator Va + fator Xa). Nesse modelo o início da coagulação se faz mediante ligação do fator VIIa ao fator tecidual (FT), também conhecido como fator III, com subsequente ativação dos fatores IX e X. O fator IX ativo irá se associar ao fator VIII, ativá-lo e juntos formarão o complexo “tenase” intrínseco, esse ativa o fator X com eficiência ainda maior. O fator Xa forma um complexo com o fator Va (complexo “protrombinase”), convertendo o fator II (protrombina) em fator IIa (trombina). Esse mecanismo pode ser visualizado na Figura 02.

Simultaneamente a esses processos de formação do trombo, independentemente da via utilizada, existe a ação de fatores anticoagulantes (fisiológicos) que impedem a propagação desse trombo tais como: proteína C e S, antitrombina (AT), cofator II da heparina (HCII).

Assim, quando se evidencia um desequilíbrio entre os processos de formação do coágulo (coagulação) e dissolução do mesmo (fibrinólise), a chance de se adquirir uma doença cardiovascular torna-se bastante elevada.

Apesar dos grandes progressos no que diz respeito ao conhecimento dos complexos mecanismos da coagulação sangüínea e ao diagnóstico das doenças cardiovasculares, existe um atraso no desenvolvimento de medicamentos que possam ser utilizados no tratamento de pacientes acometidos dessas doenças, fazendo com que a prevenção destas patologias continue sendo a arma mais poderosa que se dispõe para o combate destas doenças.

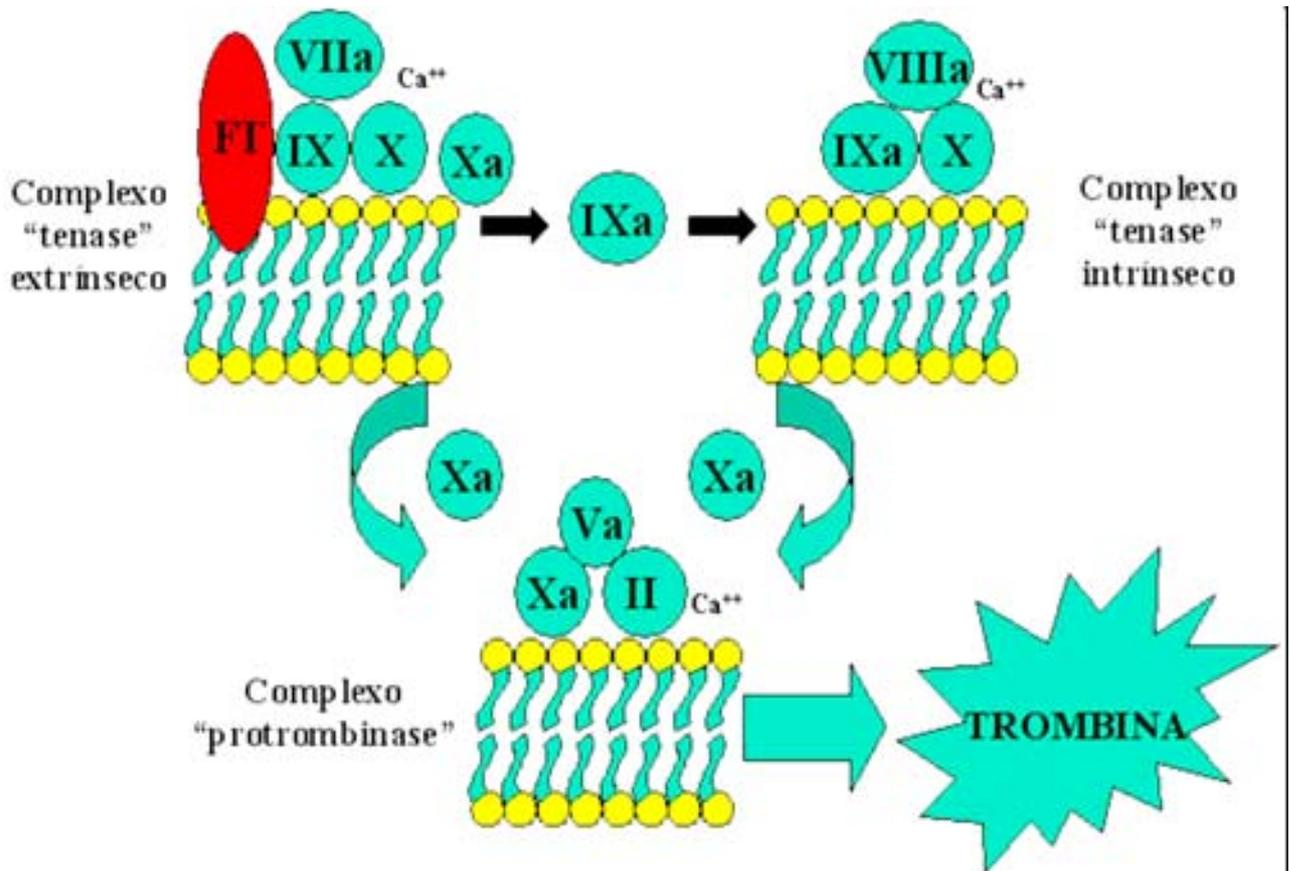


Figura 02. Novo modelo fisiológico da cascata da coagulação. Figura obtida de Franco, 2001.

Um dos principais grupos de fármacos utilizados no tratamento das doenças cardiovasculares são os anticoagulantes. Esses compostos impedem a formação de coágulos sanguíneos nos vasos. Os fármacos atualmente utilizados como anticoagulantes possuem uso restrito a certas patologias, devido, principalmente, aos seus mecanismos de ação (Hirsh, 2001; Linkins, 2003). A exceção é a heparina, que diferente dos outros anticoagulantes, não é restrita a uma determinada patologia, podendo, ser ministrada em diferentes diagnósticos.

A heparina foi o primeiro composto usado como agente anticoagulante e antitrombótico. Ela foi primeiramente isolada a partir de fígado de cachorro em 1916 por McLean, no Canadá. As preparações de heparina comercial, utilizadas clinicamente há 60 anos, são extraídas, principalmente, do intestino de suínos e pulmão de bovinos. A heparina é um polissacarídeo constituído por repetições de glucosamina e ácido idurônico sulfatados. Estudos demonstram que a presença de uma unidade básica repetitiva pentassacarídica sulfatada da heparina é extremamente importante, pois esta unidade seria responsável pela capacidade deste composto de se ligar e potencializar a ação da AT e do HCII, bem como, se ligar a fatores da cascata de coagulação, conferindo a heparina sua atividade anticoagulante (Nader *et al.*, 2004). A heparina é usada principalmente na prevenção de trombose venosa profunda, em pós-cirurgias e pós-partos, e em pacientes com estado de hipercoagulopatia, ou sujeitos a trombose causada por diferentes etiologias. A heparina é o único polissacarídeo sulfatado atualmente utilizado como anticoagulante, entretanto, ela pode apresentar algumas reações adversas indesejáveis, como o aparecimento de trombocitopenia em alguns pacientes, decorrente do seu uso prolongado (Fabris *et al.*, 2000), como também, ela pode apresentar o risco existente de contaminação viral, uma vez que é obtida de tecidos animais. Outro problema observado é o efeito hemorrágico residual da heparina, apresentado mesmo por fragmentos de heparina que não possuem atividade anticoagulante (Nader *et al.*, 1979, 2001, 2004). Devido a estes efeitos adversos no uso da heparina, atualmente, tem sido utilizado um composto obtido do fracionamento da heparina nativa (não-fracionada) chamado de heparina de baixo peso molecular (LMWH) que diminui o risco destes destas reações ocorrerem.

Contudo, a LMWH ainda apresenta algumas reações adversas e possui uso restrito a certas patologias.

Na tentativa de se encontrar novos compostos anticoagulantes, as algas marinhas têm surgido como uma ótima alternativa, devido ao fato de serem ricas em polissacarídeos sulfatados, os quais, extraídos destes seres vivos, estão ausentes do risco de contaminação viral. Outro fator importante na escolha das macroalgas como matéria prima para obtenção desses compostos é que, além de estarem em abundância na natureza e serem recursos naturais renováveis, existe a possibilidade de se necessário, serem cultivadas. (Albuquerque *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005a, 2005b; Silva *et al.*, 2005).

As macroalgas marinhas podem ser divididas em três grandes grupos, levando em consideração os pigmentos nelas existentes: as algas vermelhas (Rodophytas), marrons (Phaeophytas) e verdes (Clorophytas). Os polissacarídeos sulfatados encontrados nas algas vermelhas são as galactanas sulfatadas. A atividade anticoagulante para esses compostos foi inicialmente descrita por Chargaf *et al.*, (1936). e, atualmente, vários pesquisadores têm se interessado por galactanas de algas (Lahaye, 2000; Pereira *et al.*, 2005). Das algas marrons, extrai-se as homofucanas e as heterofucanas, que são polissacarídeos constituídos principalmente de L-fucose sulfatada, contudo outros monossacarídeos podem ser encontrados e atualmente são os polissacarídeos extraídos de algas marinhas melhores estudados com relação à atividade anticoagulante (Boisson-Vidal *et al.*, 1995; Dürig *et al.*, 1997; Haroun-Bouhedja *et al.*, 2000; Berteau; Mulloy, 2003). As algas verdes apresentam polissacarídeos sulfatados mais heterogêneos do que as algas vermelhas e marrons, sendo ricos em galactose, manose, xilose, arabinose, glicose e ou ácidos urônicos (Jurd, 1995; Hayakawa *et al.*, 2000; Matsubara, 2004).

Pesquisas realizadas com polissacarídeos sulfatados de algas têm demonstrado que tanto a composição quanto a estrutura desses compostos variam de espécies para espécies e, às vezes, em diferentes partes do mesmo espécime (Farias, 1992; Dietrich *et al.*, 1995; Alves, 2000; Haroun-Bouhedja *et al.*, 2000). A complexidade na estrutura desses compostos é devido às muitas possibilidades de ligações entre os monossacarídeos e a distribuição de grupamentos sulfato. Portanto, cada polissacarídeo pode possuir conformação estrutural única, e, conseqüentemente, apresentar atividades anticoagulantes diferentes e ou mais potentes de que outros polissacarídeos ou outros compostos já descritos.

Dentre os polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas, os extraídos de algas verdes são de longe os menos estudados quanto as suas atividades biológicas, incluindo a anticoagulante. Esses se apresentam mais heterogêneos, no que diz respeito a sua composição e estrutura, do que aqueles encontrados em outras algas, o que torna difícil o entendimento da relação entre esses polissacarídeos sulfatados e suas atividades farmacológicas. Logo, neste contexto, no qual se evidencia a pouca exploração desses compostos, recentemente grupos de pesquisa têm demonstrado mais interesse por algas verdes e o gênero *Codium* é, atualmente, o que mais tem sido estudado (Siddhanta *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000).

Com relação à inibição da formação da trombina, as algas do gênero *Codium*, se mostram possuidoras de compostos sulfatados com função anticoagulante. Essa inibição foi verificada de varias formas, podendo ocorrer pelas vias intrínseca, extrínseca e ou comum da cascata de coagulação, além de, em alguns casos, esses compostos atuarem sobre o cofator II da heparina (HCII) e a antitrombina (AT) como potencializadores de suas funções (Hayakawa *et al.*, 2000; Matsubara *et al.*, 2001).

O primeiro relato de polissacarídeos anticoagulantes de *Codium* foi feito por Deacon-Smith *et al.* (1985). Posteriormente, foi extraído e purificado de *Codium fragile* um anticoagulante composto de xilose, arabinose e galactose que teve sua ação na potencialização do Cofator II da Heparina (HC II) e Antitrombina (AT) (Jurd, 1995). Diferente disso, Matsubara *et al.* (2001) isolaram uma fração polissacarídica da alga *Codium cylindricum*, constituída principalmente de galactose que se mostrou um potente anticoagulante, no entanto, diferentemente das outras algas estudadas desse gênero, esta não potencializou a antitrombina (AT) como também o cofator II da heparina (HCII).

Devido a grande diversidade na composição dos polissacarídeos sulfatados encontrados nas macroalgas marinhas, e principalmente nas algas verdes, torna-se difícil à comparação de anticoagulantes encontrados na mesma divisão e/ou no mesmo gênero de algas. As análises existentes comparam sempre polissacarídeos com características estruturais semelhantes independente de sua origem, como exemplo galactanas sulfatadas de algas e ouriços (Melo *et al.*, 2004).

Galactanas sulfatadas são polissacarídeos que apresentam, como principal monossacarídeo em sua composição, a galactose sulfatada. Estes compostos podem se apresentar na forma de heterogalactanas, os quais contém outros monossacarídeos tais como, xilose, arabinose, glicose, manose, além da galactose em sua composição e de homogalactanas (homopolímeros de galactose) (Lahaye, 2001). Esses polímeros já foram identificados em algas marrons (Nishino *et al.*, 1994), angiospermas (Aquino *et al.*, 2005), invertebrados marinhos (Pereira *et al.*, 2002), algas verdes (Matsubara 2004), mas é nas algas vermelhas que eles são encontrados em maior quantidade (Lahaye, 2001).

Os estudos mais avançados que correlacionam estrutura e atividade de galactanas sulfatadas foram obtidos com polímeros extraídos das algas vermelhas *Botryocladia occiedentalis* e *Gelidium crinale*. De *B. occiedentalis* foram purificadas três galactanas, sendo denominadas F1, F2 e F3, das quais somente as frações F2 e F3 mostraram potente ação anticoagulante em testes de aPTT (tempo de tromboplastina parcial ativada). Este teste (aPTT) mede a atividade anticoagulante de compostos que tem como alvo de ação a via intrínseca da cascata de coagulação. Estas galactanas da *B. occiedentalis* eram compostas por unidades dissacarídicas repetidas de $-4-\alpha\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Gal1}\rightarrow$ com variáveis padrões de sulfatação, sendo um terço das α - unidades composto por $\alpha\text{-Gal 2-3-di-O-sulfatada}$ e outro terço 2-O-sulfatada. Nos testes de aPTT, as frações F2 e F3 apresentaram respectivamente 150 UI/mg e 130 UI/mg, e ambas potencializaram a inibição de trombina e fator Xa por antitrombina (AT) e/ou cofator II da heparina (HCII) (Farias *et al.*, 2000). Recentemente, Pereira *et al* (2005) isolaram outra galactana da alga *Gelidium crinale* composta também por repetições de $-4-\alpha\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-Gal1}\rightarrow$, com 15% das α -unidades 2-3-di-O-ssulfatadas e outros 55% sendo 2-O-sulfatada. Quando verificada a atividade anticoagulante por teste de aPTT, a galactana apresentou 60 UI/mg sendo sua ação dada pela potencialização da inibição da trombina pela AT e fator Xa.

Já Melo *et al* (2004) analisaram composição, estrutura, tamanho, atividade anticoagulante e mecanismos de ação de galactanas extraídas da alga *Botryocladia occiedentalis* e de invertebrados marinhos. O dados obtidos neste trabalho foram comparados com os da heparina, na tentativa de verificar os requisitos necessários para galactanas sulfatadas se apresentarem como anticoagulantes. Segundo os autores, as galactanas sulfatadas necessitam de cadeias significativamente maiores

do que a heparina para demonstrar atividade anticoagulante. Também foi inferido pelos mesmos que, estes compostos precisam ter, aproximadamente, entre 15 e 45 kDa para se ligarem a antitrombina (AT), e que esses valores não são suficientes para a ligação a outros inibidores e a trombina.

Assim, tendo em vista a grande variabilidade estrutural, fisiológica e farmacológica dos polissacarídeos sulfatados encontrados nas diferentes classes e espécies de algas marinhas, torna-se necessário um maior aprofundamento no estudo desses compostos, pois o entendimento do mecanismo de ação destes, ajudaria no tratamento das diversas patologias, em que essas substâncias venham a atuar. Além disso, o isolamento de um novo composto traz novas perspectivas de descoberta de um novo fármaco e/ou fontes de matérias primas para serem empregadas na indústria. Baseado nisso, este presente estudo tem como objetivos:

- Extrair e purificar polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha *Codium isthmocladum*;
- Determinar a composição química dos polissacarídeos extraídos;
- Analisar a atividade anticoagulante desses compostos, utilizando kits comerciais de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e tempo de protrombina (PT), como também, a ação destes sobre a agregação plaquetária.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – MATERIAL BIOLÓGICO

Alga marinha verde *Codium isthmocladum*

Filo: Clorophyta

Classe: Clorophyceae

Ordem: Bryopsidales

Família: Codiales

Gênero: *Codium*

Espécie: *Codium isthmocladum*



Figura 03. Alga marinha verde *Codium isthmocladum* utilizada neste trabalho. Seta indica a alga objeto deste estudo.

A alga utilizada neste trabalho foi coletada na praia de Búzios no litoral sul do Rio Grande do Norte em marés baixas (entre 0.0 e 0.2 metros). Após ser coletada, a alga foi levada ao laboratório (BIOPOL – Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais), onde foi lavada e retiradas as epífitas e inclusões calcárias. Em seguida ela foi seca em estufa a 45°C, triturada e guardada em recipientes apropriados.

2.2 – OUTROS MATERIAIS

2.2.1 – Reagentes

- Acetona, metanol, etanol, da Qeel (São Paulo – SP).
- Ácido acético, Cloreto de sódio, da VETEC (Rio de Janeiro – RJ).
- Álcool 96°, da Sertanejo (Dix Sept Rosado – RN).
- Agarose, adquirida da Bio Agency (São Paulo – SP).
- Butanol, tiosulfato de sódio, da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Ácido sulfúrico, ácido clorídrico, da Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Azul de toluidina, vermelho de cresol, coomasie blue R 250, oriundos da Sigma
- Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).
- Maxatase (protease alcalina P 126), da BIOCON do Brasil industrial Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Resina de troca iônica Lewatite da Bayer, gentilmente cedida por Açúcar Guarani S/A (Olímpia, São Paulo, lote AD001, safra 95/96).
- 1,3 diamino propano acetato, da Aldrich Chemical Co. Inc. (Milwake, WI, EUA).

Todos os demais reagentes utilizados foram da melhor qualidade disponível.

2.2.2 – Padrões

- Heparan sulfato, condroitin sulfato e dermatan sulfato e D-galactose, da SIGMA (São Paulo – SP).
- L-fucose, D-xilose, D-galactose, D-manose, D-glucose, D-arabinose, D-ramnose, ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

2.2.3 – Aparelhos

- Agitador orbital modelo 255-B da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Banhos e estufas de temperatura constante da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Bombas peristálticas Microperpex S modelo 2232 da LKB (Bromma, Suécia) e Econo
- Câmara para eletroforese em gel de agarose, modelo desenvolvido por Jaques e col. (1968) (Técnica Permatron Ltda., São Paulo, SP, Brasil).
- Centrífuga refrigerada CR 21 da Hitachi Koki Co. Ltd. (Tóquio, Japão);
- Espectrofotômetros Femto 700 plus da Femto Ind. Com. Instrumentos LTDA (São Paulo).
- Fontes de corrente contínua regulável desenvolvidas pelo Dr. H. Rzeppa, Técnica
- Permatron Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Medidor de pH Orion Research, modelo 701 A/digital Ionalyzer (Cambridge, MA, EUA).

2.2.4 – Plasma humano

O sangue humano foi coletado sobre citrato de sódio (concentração final 0,82%), sob agitação leve, em frasco de polietileno esterilizado. O plasma foi separado por centrifugação e alíquotas de 10 mL foram estocadas a -20°C em frascos de vidro esterilizados.

2.3 – OBTENÇÃO DO “PÓ CETÔNICO”

A alga utilizada neste trabalho foi submetida à despigmentação e delipidação, com a adição de dois volumes de acetona PA. Esta solução ficou à temperatura ambiente durante o período de 24 horas. Posteriormente, a mistura foi decantada e o resíduo colocado para secar. Esse resíduo, denominado de “Pó Cetônico”, foi utilizado em seguida na proteólise.

2.4 – OBTENÇÃO DO “CRU DE POLISSACARÍDEOS” (PROTEÓLISE)

Para a realização desta etapa, foram adicionados dois volumes de NaCl 0,25 M ao “Pó cetônico” (100 g) tendo, essa solução, seu pH ajustado para 8,0 com NaOH. Adicionou-se a este material a enzima maxatase (Proteolítica) na proporção de 15mg/g de Pó Cetônico. O recipiente com esse material foi colocado em banho maria a 60°C durante um período de 16 horas. Depois, este foi filtrado e o sobrenadante submetido a uma centrifugação (10.000 g, durante 10 minutos à 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante, que contém todos os polissacarídeos solúveis foi denominado de “cru de polissacarídeos”. Uma pequena alíquota deste

“cru de polissacarídeos” foi retirada e a ela adicionado dois volumes de metanol. Esta mistura foi deixada à temperatura ambiente durante 24 horas. Após esse período, o material foi centrifugado (10.000 g, durante 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco à pressão reduzida, triturado, pesado e devidamente guardado para posteriores análises.

O restante do sobrenadante obtido teve seu volume devidamente medido e foi utilizado na etapa posterior.

2.5 – FRACIONAMENTO COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ACETONA

Ao “cru de polissacarídeos” obtido na proteólise realizada com a alga *C. isthmocladum* foram adicionados volumes crescentes de acetona. As frações foram obtidas à medida que se adicionava a acetona e verificava-se a turbidez da mistura. As frações referentes obtidas foram mantidas por 18 horas a 4°C. Posteriormente foram centrifugadas (10.000 g, durante 10 minutos a 4°C) e secas à pressão reduzida. Dessa maneira foram obtidas seqüencialmente as seguintes frações: F 0.3 (a qual foram adicionados 0,3 volumes de acetona); F 0.5 (0,5 volumes de acetona); F 0.7 (0,7 volumes de acetona); F 0.9 (0,9 volumes de acetona); F 1.2 (1,2 volumes de acetona). Esse processo de fracionamento pode ser melhor visualizado na Figura 4.

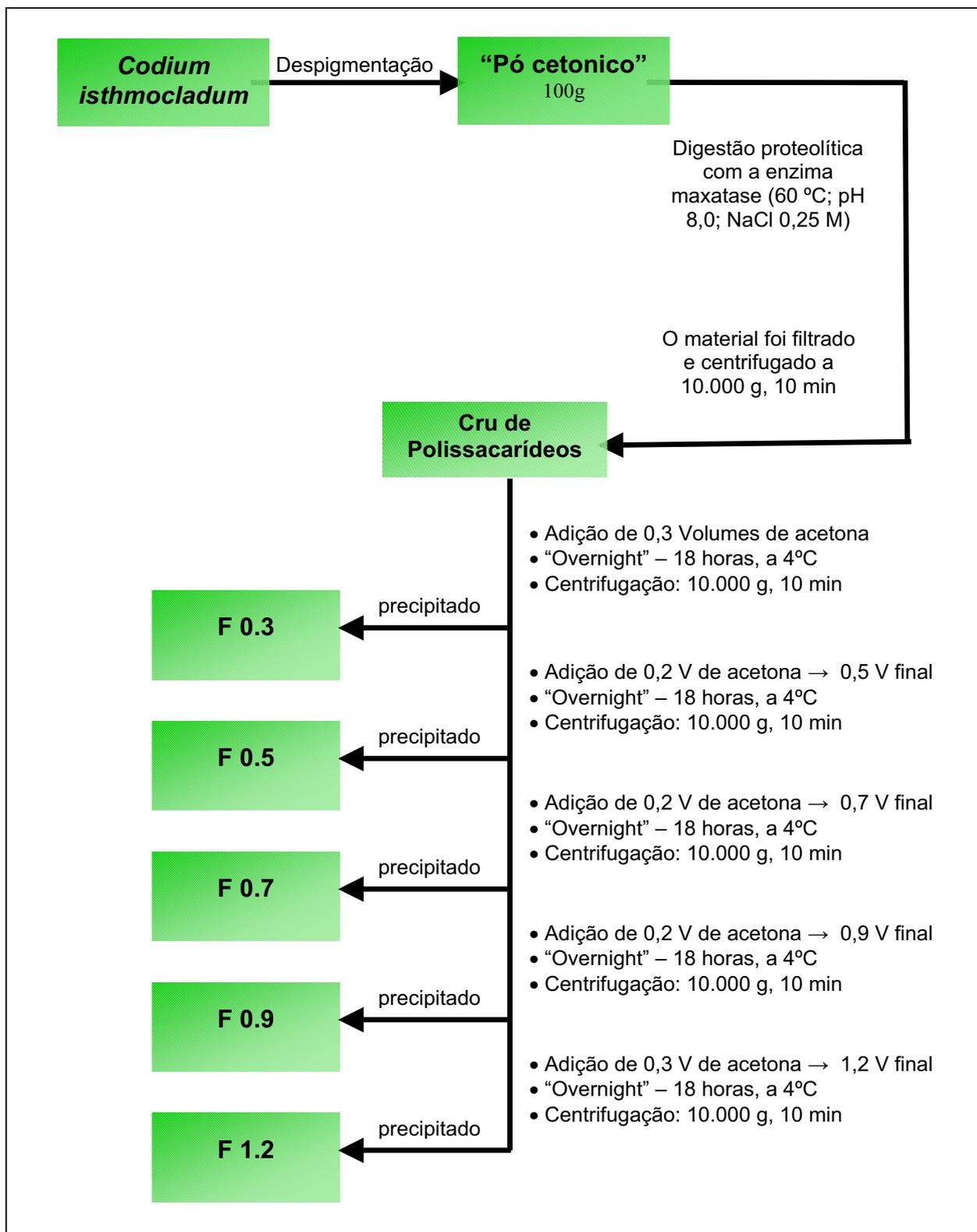


Figura 04. Esquema de obtenção das frações cetônicas de polissacarídeos da alga *Codium isthmocladum*.

2.6 – CROMATOGRAFIAS

2.6.1 – Cromatografia de troca iônica

A fração F 0.9, obtida por precipitação com volumes crescentes de acetona foi submetida a fracionamento, por complexação com resina de troca iônica Lewatite, na proporção de 2g da F 0.9 (diluída em NaCl 0,3 M) para 300 mL de resina. A eluição do material complexado foi realizada por “step wise” utilizando molaridades crescentes de NaCl (0,3 – 0,5 – 0,7 – 1,0 – 1,5 – 2,0 – 2,5 – 3,0 M), como descrito por Dietrich *et al* (1995). O fluxo de eluição foi de 1 mL/min e a presença dos polissacarídeos sulfatados em cada fração foi determinada por metacromasia, utilizando um papel filtro seco previamente embebido com azul de toluidina, no qual eram adicionadas gotas retiradas direto da coluna, e pelo método fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956). As frações positivas para presença de polissacarídeos sulfatos (F 2,0 M e F 3,0 M de NaCl) foram precipitadas com 2 volumes de metanol a 4°C, “overnight” (18 h) e posteriormente, coletadas por centrifugação a 10.000 x g, por 10 minutos, secas a pressão reduzida, pesados e submetidas a análises. Essas frações obtidas, F 2,0 M e F 3,0 M de NaCl, foram denominadas galactana 1 (Gal 1) e galactana 2 (Gal 2), respectivamente.

2.6.2 – Cromatografia em papel (sistema descendente)

As frações polissacarídicas obtidas nos processos de fracionamento com acetona (F 0.3; F 0.5; F 0.7; F 0.9; F 1.2) e cromatografia de troca iônica (Gal 1 e Gal 2) foram hidrolisadas com 2N de HCl por 2 horas a temperatura de 100°C. Após

hidrólise, as frações foram secas (3 vezes) a pressão reduzida na presença de pastilhas de NaOH. Por fim o hidrolisado foi ressuspenso, aplicado em papel Whatman nº 01 e submetido aos seguintes sistemas de solventes:

- A) Butanol: piridina: água (3:2:1,5) v/v;
- B) Acetato de etila: piridina: água (8:2:1) v/v;
- C) Ácido isobobutírico: amônia (3:6) v/v.

Os compostos com poder redutor foram visualizados através de revelação com prata em meio alcalino (Trevelyan *et al.*, 1950).

2.7 – ELETROFORESES

2.7.1 – Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose foi preparado na concentração 0,6% no tampão 1,3 diamino propano acetato (PDA) e colocado sobre lâminas de vidro (7,5 X 7,5 cm X 1,5 mm, ou 5,0 X 7,5 cm X 1,5 mm). Cinco microlitros de cada fração polissacarídica na concentração de 10 mg/mL foram aplicadas em canaletas no gel e submetidos à eletroforese em cuba resfriada a 4°C. Nas eletroforeses realizadas, foram utilizados como padrões glicosaminoglicanos sulfatados (HS – heparam sulfato; CS – condroitim sulfato; DS – dermatam sulfato). Após a corrida eletroforética (a 100 Volts), os compostos foram precipitados com CETAVLON 0,1% por no mínimo 2 horas, a temperatura ambiente. Depois, o gel foi submetido a uma corrente de ar quente para ser secado e corado com azul de toluidina 0,6%. O excesso de corante foi removido por uma solução de ácido acético 1% em etanol 50% (solução

descolorante). Após remoção do corante em excesso, a lâmina revelada foi seca à temperatura ambiente e analisada.

2.7.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada como proposta por Hilborn & Anastassiadis (1971) e modificada por Dietrich & Nader (1974).

O gel de poliacrilamida foi preparado com 1,2 g de acrilamida (6% na solução final), 36 mg de bisacrilamida (0,16%) e 14 mg de persulfato de amônio adicionados a 20 mL de tampão barbiturato sódico 0,06M, pH 8,6. A solução foi submetida a vácuo durante 5 minutos, a 4°C. Após a adição de 20 µl de TEMED, a solução foi transferida para placas de vidro, conforme descrito por Vesterberg (1972). A eletroforese foi feita em géis de 5,0 x 7,5 cm ou 7,5 x 7,5 cm, com uma espessura de 0,2 cm.

Cerca de 20 µg de polissacarídeos foram aplicados ao gel em um volume de 2 µl sobre pequenas tiras de papel Whatman nº 1, deixando-se 10 minutos à temperatura ambiente para permitir uma boa penetração do composto nas malhas do gel. A seguir este foi submetido a uma diferença de potencial de 8 V/cm, durante aproximadamente 30 minutos. A visualização da migração dos compostos foi observada através de coloração com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1%. A descoloração foi realizada com ácido acético 1%.

Este método correlaciona a distância percorrida pelo composto com o inverso do logaritmo de sua massa molecular. Os pesos moleculares foram determinados tomando como referência as migrações dos heparam sulfatos (C e D) e heparina

(glicosaminoglicanos - padrão de peso molecular). Esses padrões foram aplicados em cada corrida eletroforética em que a amostra foi avaliada.

2.8 – ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho foi realizada em espectrômetro Perkin-Elmer, de 4400 a 400 cm^{-1} no Departamento de Química da Universidade Federal do Rio grande do Norte. As frações polissacarídicas Gal 1 e Gal 2 (5 mg cada) foram analisadas após secagem em aparelho de Abdenhalden, sob forma de pastilha de KBr contendo P_2O_5 a 60°C.

2.9 – ANÁLISES QUÍMICAS

2.9.1 – Dosagem de açúcares totais

Açúcares totais foram determinados pelo método do fenol/ácido sulfúrico, utilizando-se como padrão galactose, sendo as leituras realizadas a 490 nm (Dubois *et al.*, 1956).

2.9.2 – Dosagem de sulfato

O teor de sulfato total foi quantificado, após uma hidrólise ácida com 4 N de HCl por 6 horas à temperatura de 100°C de cada fração polissacarídica, por turbidimetria pelo método da gelatina-bário, tendo-se como padrão o sulfato de sódio (Dodgson; Price, 1962),

2.9.3 – Dosagem de proteínas

O teor de proteína correspondente de cada fração foi determinado com o reagente de comassie blue R 250 e a leitura realizada a 595 nm (Spector, 1978).

2.10 – ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

Os ensaios de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e tempo de protrombina (PT) foram realizados seguindo o protocolo fornecido pelos “kits” comerciais adquiridos (Labtest). O plasma citratado utilizado nestes ensaios foi obtido após a centrifugação de sangue humano retirado de indivíduos adultos, sadios e de ambos os sexos. Foi verificada, através desses ensaios, a massa de cada fração polissacarídica, necessária para prolongar em duas vezes o tempo normal de coagulação. Foram utilizadas como meio de comparação da atividade anticoagulante, a heparina (não fracionada) e a clexane® (heparina de baixo peso molecular). O tempo de coagulação foi determinado utilizando-se um coagulômetro automático da marca Drake.

2.11 – AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

2.11.1 – Preparação do plasma rico em plaqueta (PRP) e pobre em plaqueta (PPP)

Após a coleta do sangue humano, a este foi adicionado nitrato de sódio a 3,8% (9:1 v/v) e em seguida centrifugado a 1.000 RPM por 6 minutos. O

sobrenadante foi separado e denominado de plasma rico em plaqueta (PRP), o qual possui cerca de 250.000 plaquetas / mm³ de plasma. O plasma restante desta centrifugação foi utilizado para obtenção do plasma pobre em plaqueta (PPP). Foi realizada uma centrifugação adicional do plasma a 3.000 RPM por 15 minutos e o sobrenadante (PPP) separado.

2.11.2 – Ensaio de agregação plaquetária

Os ensaios de agregação plaquetária foram realizados no agregômetro PACKS-4[®] (Plaquet aggregation Chromogenic kinetics System- 4) pelo método turbidimétrico de Born (1970). Foram pipetados 450 µL de PRP e colocados em uma cuveta de vidro siliconizada e mantidos por 3 minutos a 37°C. Posteriormente foram adicionados 50 µL de ADP (3 µM), colágeno (5 µg/µL) (controles positivos) e de soluções contendo Gal 1 ou Gal 2 (25 – 50 – 250 µg) cada qual, soluções (Gal 1 e 2) e controles (ADP e colágeno), em uma cuveta. O tempo de agregação usado foi de 7 minutos. Todos os ensaios foram realizados nas dependências do laboratório de hematologia do HEMONORTE (Natal, RN).

3 – RESULTADOS

3.1 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES CETÔNICAS DA ALGA *Codium isthmocladum*

Após a obtenção do “cru de polissacarídeos” por proteólise, o material extraído foi submetido a um fracionamento com acetona. Com esse fracionamento foram obtidas cinco frações cetônicas da alga *Codium isthmocladum* (F 0.3, F 0.5, F 0.7, F 0.9, F 1.2).

Todas as frações, depois de extraídas, foram secas, pesadas e posteriormente calculados os seus rendimentos. O peso obtido para cada fração foi comparado com o total da soma dos pesos de todas as frações cetônicas, assim observou-se o rendimento percentual de cada fração (Figura 05). A F 0.7 foi a fração cetônica que apresentou melhor rendimento percentual com 28 % da massa total extraída da alga. Já a F 1.2 apresentou o menor rendimento percentual com apenas 5 %. As frações F 0.3, F 0.5 e F 0.9 apresentaram um rendimento percentual de 18, 26 e 23% respectivamente. Esses resultados podem ser visualizados na Figura 05.

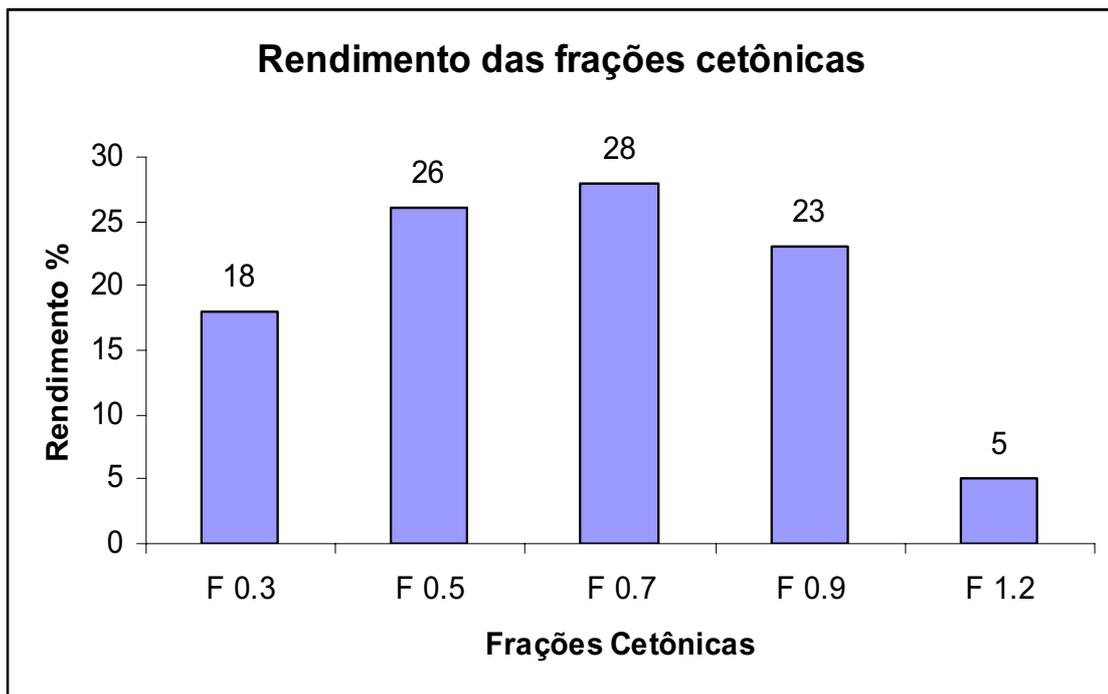


Figura 05. Rendimento percentual das frações obtidas por precipitação com acetona, da alga marinha *Codium isthmocladum*.

3.2 – CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DAS FRAÇÕES CETÔNICAS

A análise qualitativa dos monossacarídeos constituintes das frações cetônicas foi realizada em cromatografia descendente em papel. Após revelação do cromatograma obtido com solvente butanol, piridina e água não foi possível distinguir claramente os monossacarídeos presentes nas frações cetônicas, pois este sistema de solvente não separou claramente os monossacarídeos existentes nestas frações (Figura 06 B). No entanto, quando estas frações hidrolisadas foram submetidas à cromatografia utilizando acetato de etila, piridina e água como solvente (Figura 06 B), foi possível identificar a composição monossacarídica das frações

cetônicas. Foi observado que todas as frações cetônicas da alga *C. isthmocladum* são compostas pelos mesmos três monossacarídeos: galactose, arabinose e manose. Porém estes não se distribuíram de forma uniforme dentre as cinco frações cetônicas (Figura 06). Por exemplo, a arabinose apresentou uma banda mais densa na F 0.5 do que nas outras frações cetônicas, indicando que, provavelmente, este monossacarídeo está em maior quantidade nesta fração. A análise quantitativa destes monossacarídeos presentes nestas frações cetônicas foi realizada por densitometria dos cromatogramas revelados (Tabela I). Foram observados traços de xilose em todas as frações cetônicas, mas esses não foram quantificados.

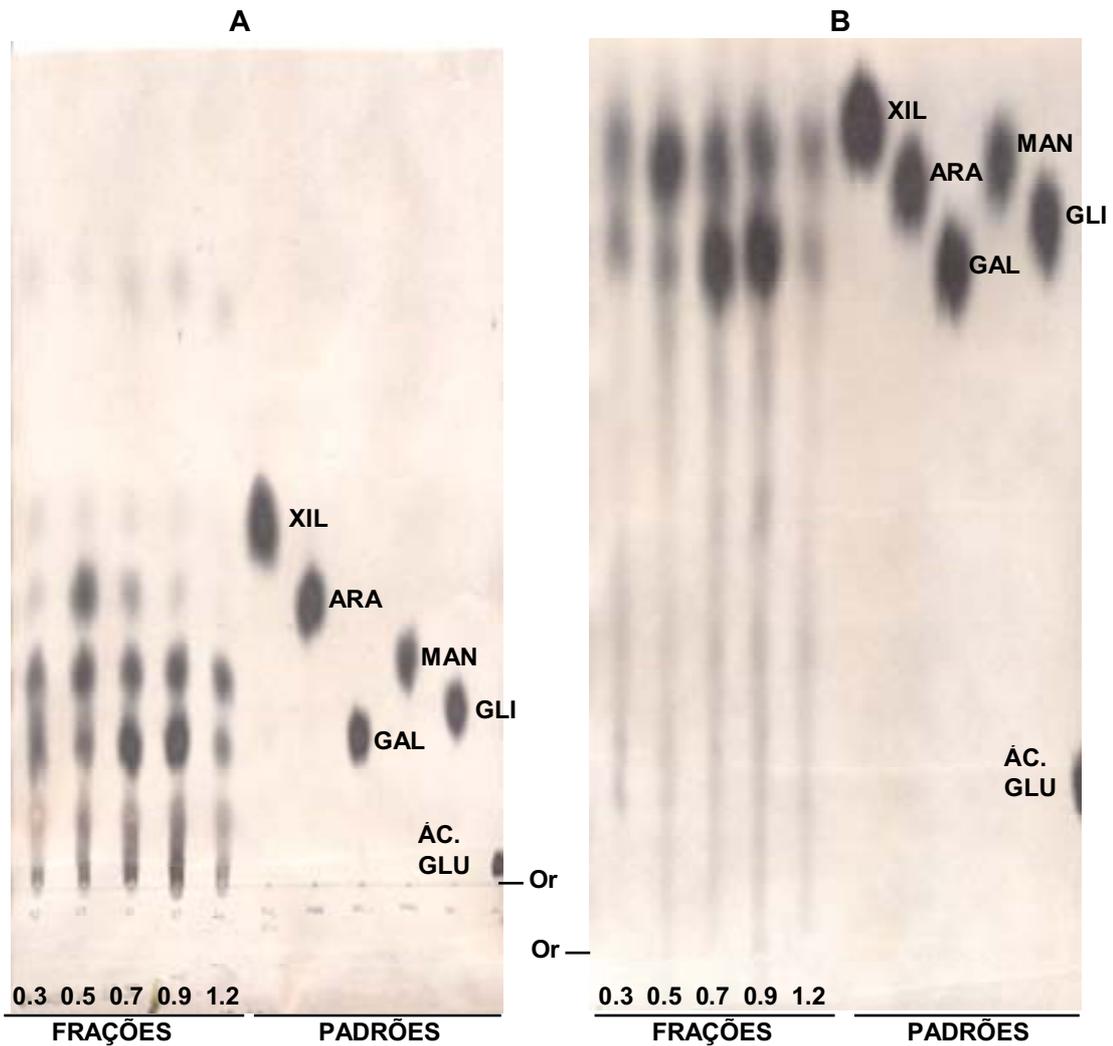


Figura 06. Cromatografia descendente em papel dos hidrolisados das frações cetônicas da alga *C. isthmocladum*. Aliquotas de cada fração cetônica hidrolisada, foram aplicadas nas origens correspondentes, juntamente com os padrões de monossacarídeos e submetidos a cromatografias em diferentes solventes. **(A)** Acetato de etila: piridina: água (8:2:1). **(B)** Butanol: piridina: água (3:2:1,5). **Or**, origem; **XIL**, xilose; **ARA**, arabinose; **GAL**, galactose; **MAN**, manose; **GLI**, glicose; **ÁC. GLU**, ácido glucurônico.

3.3 – ANÁLISES QUÍMICAS DAS FRAÇÕES CETÔNICAS

Para se determinar a quantidade de polissacarídeos e sulfato existentes nas frações cetônicas obtidas da alga, foram feitas dosagens de açúcares totais e de sulfato em todas frações. Também foi determinado o grau de contaminação protéica.

Todas as frações cetônicas demonstraram a presença de polissacarídeos sulfatados, o que depois foi confirmado por técnica de eletroforese. Com relação à dosagem de açúcar total, a F 0.9 apresentou 56,9 % da sua constituição de açúcar, enquanto a F 0.3 somente 14,4 %. A F 1.2 também apresentou uma percentagem de açúcar baixa (16,8%) se comparado as outras frações cetônicas obtidas (Tabela I). Já com relação a ao sulfato presente nestas frações, os resultados indicaram a presença deste constituinte em todas as frações cetônicas (dados mostrados em relação molar). O teor de contaminação protéica foi baixo para todas as frações atingindo o máximo de 1,5 % na F 0.7 e o mínimo de 0,6% na F 0.3 (Tabela I).

Na mesma tabela pode ser observado a relação molar dos monossacarídeos existentes. Esses valores foram obtidos a partir da densitometria realizada com cromatogramas das frações cetônicas, que permitiu a identificação quantitativa dos monossacarídeos presentes nestas frações. A galactose foi o constituinte utilizado como referência na relação molar entre os monossacarídeos presentes nas frações cetônicas. As frações F 0.3 e F 0.5 apresentaram a arabinose como constituinte em maior quantidade. Nas F 0.7 e F 0.9 a manose apareceu em maior quantidade (1,2), porém bem semelhante a galactose, enquanto na F 1.2 a manose (5,6) está em quantidade bem maior que a galactose e arabinose (0,5).

TABELA I

Análises químicas e relações molares dos açúcares e do sulfato presentes nas frações cetônicas da alga *Codium isthmocladum*

Frações	Açúcar Total %	Proteína %	SO ₃ Na %	Relações Molares			
				GAL ¹	MAN ¹	ARA ¹	SO ₃ Na
F 0.3	14,4	0,6	4,2	1	0,5	2,0	2,0
F 0.5	44,7	1,3	12,3	1	5,0	8,5	3,0
F 0.7	47,3	1,5	11,6	1	1,2	0,1	0,4
F 0.9	56,9	1,1	9,8	1	1,2	0,2	0,5
F 1.2	16,8	0,8	2,9	1	5,6	0,5	1,0

¹ relação molar de açúcar, tendo a galactose como referência **GAL**, galactose; **MAN**, manose; **ARA**, arabinose

3.4 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DAS FRAÇÕES CETÔNICAS.

As frações cetônicas após a precipitação e centrifugação foram solubilizadas em água destilada a uma concentração final de 10 mg/mL e submetidas a análise em eletroforese. Cinco microlitros (50µg) das soluções das frações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose e o perfil eletroforético observado após a revelação da lâmina.

Uma vez que o azul de toluidina se complexa com compostos sulfatados e passa a apresentar coloração violácea, foi possível confirmar a presença de polissacarídeos sulfatados na alga *Codium isthmocladum* em todas as frações obtidas com acetona (Figura 07). Porém, essa distribuição não foi uniforme, já que

se observa a presença de componentes (bandas eletroforéticas) em algumas frações cetônica que não são vistas em outras frações. As frações F 0.9 e F 1.2 apresentaram bandas com migração semelhante enquanto as demais frações apresentaram mais de um componente em sua composição (Figura 07).

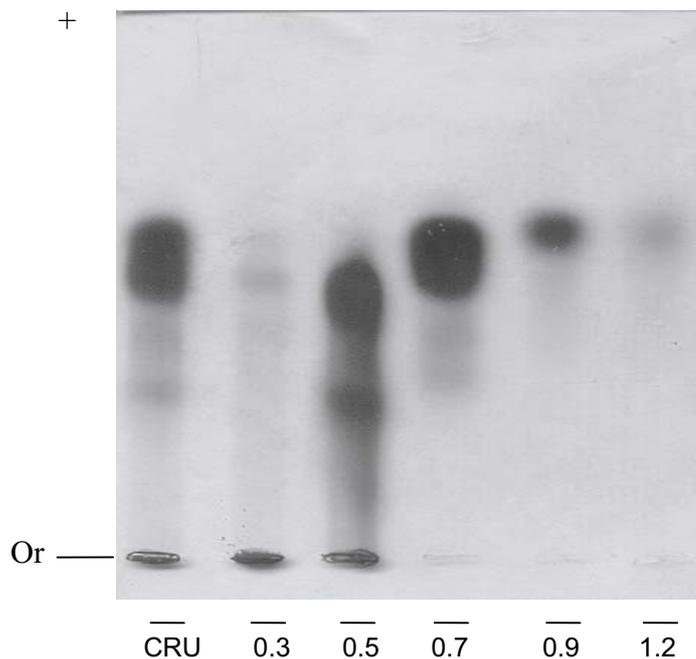


Figura 07. Comportamento eletroforético das frações cetônicas da alga *Codium isthmocladum*. Alíquotas de 5 μ l (50 μ g) das frações provenientes do fracionamento com acetona foram aplicados em laminas de agarose em tampão PDA 0,05 M, pH 9,0. Após precipitação com CETAVLON as lâminas foram coradas com azul de toluidina. **CRU**, extrato bruto de polissacarídeos; **Or**, origem.

3.5 – ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS FRAÇÕES CETÔNICAS

As frações cetônicas foram submetidas a testes de atividade anticoagulante, utilizando-se “Kits” comerciais de aPTT (via intrínseca da coagulação) de PT (via extrínseca da coagulação).

Todas frações cetônicas da alga *Codium isthmocladum* apresentaram na sua composição polissacarídeos sulfatados com função anticoagulante para o teste de aPTT. As frações F 0.9 e F 0.3 foram as que apresentaram melhor atividade anticoagulante para este teste, conseguindo dobrar o tempo normal de coagulação (30,9 s) com apenas 8,1µg e 8,7µg de massa, respectivamente. A F 1,2 foi a fração que apresentou atividade anticoagulante mais baixa, conseguindo dobrar o tempo normal de coagulação (30,9 s) com 20,0µg. Já Com relação ao teste de PT, nenhuma atividade anticoagulante foi detectada utilizando-se até 80µg de cada fração cetônica. O resultado dos testes de aPTT e PT, realizados com as frações cetônicas, pode ser visualizado na Tabela II.

TABELA II

Atividade anticoagulante das frações cetônicas da alga *Codium isthmocladum*

Frações	aPTT *	PT *
F 0.3	8,7 ± 1,6 ¹	nd**
F 0.5	10,0 ± 3,4	nd
F 0.7	11,9 ± 3,7	nd
F 0.9	8,1 ± 0,5	nd
F 1.2	20,0 ± 3,7	nd

* massa necessária (µg) para dobrar o tempo normal de coagulação; tempo controle aPTT e PT = 30,9 s e 17,2 s, respectivamente

** não detectado até 80µg

¹ desvio padrão (n=3)

3.6 – CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DA F 0.9

A fração cetônica F 0.9 devido apresentou a melhor atividade anticoagulante, demonstrou um bom rendimento e em seu perfil eletroforético verificou-se somente um componente (banda eletroforética) em sua composição, devido ao conjunto desses resultados ela foi escolhida dentre todas frações cetônicas e foi submetida a uma cromatografia de troca iônica (ver métodos).

Através dessa metodologia consegue-se separar os açúcares neutros dos açúcares ácidos, pois devido a resina utilizada ser positiva (Lewatite) somente os açúcares negativos se complexam a esta, enquanto os neutros não. O resultado positivo para metacromasia com azul de toluidina e para o método fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956) constatou que nesse processo a F 0.9 foi subdividida em mais duas frações, a primeira eluída com 2,0 M de NaCl e a segunda com 3,0 M deste mesmo sal. Esse material obtido nas concentrações 2,0 e 3,0 M de NaCl foi denominado de galactana 1 (Gal 1) e galactana 2 (Gal 2), respectivamente. As frações eluídas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose em tampão PDA. Observou-se após revelação da lâmina que duas frações (Gal 1 e 2) obtidas nessa etapa de purificação apresentaram somente um componente (banda eletroforética) e que este componente apresentou perfil de migração semelhante estas frações (Figura 08).

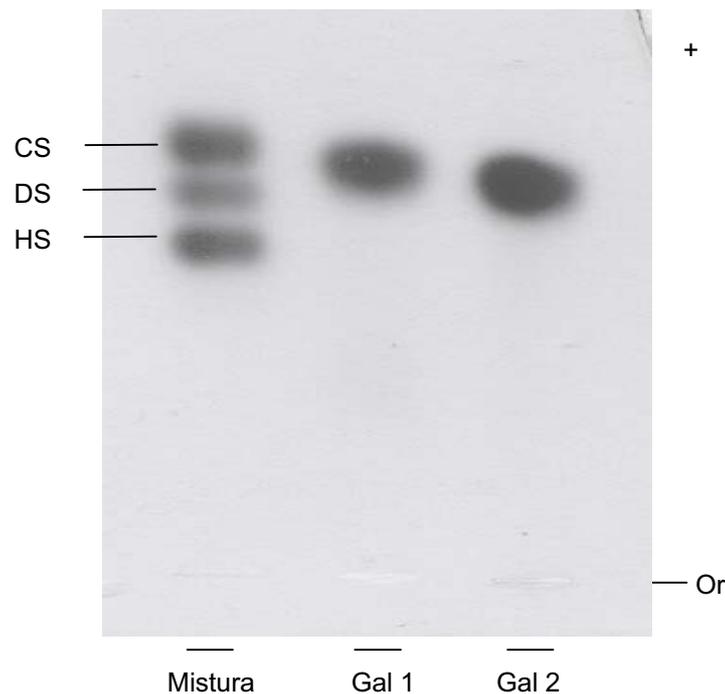


Figura 08. Comportamento eletroforético das Gal 1 e Gal 2, resultantes da cromatografia de troca iônica da F 0.9 da alga *Codium isthmocladum*. Alíquotas de 5 μ l (50 μ g) das Gal 1 e Gal 2 foram aplicadas em lâminas de agarose em tampão PDA 0,05 M, pH 9,0. Após precipitação com CETAVLON as lâminas foram coradas com azul de toluidina. **Mistura**, padrão de glicosaminoglicanos; **Gal 1**, galactana 1, **Gal 2**, galactana 2; **CS**, condroitim sulfato; **DS**, dermatam sulfato; **HS**, heparam sulfato; **Or**, origem.

3.7 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DAS GAL 1 E GAL 2

Na tentativa de determinar a massa molecular das galactanas 1 e 2, estas foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida.

Após revelação da lâmina foi possível verificar que as Gal 1 e 2 apresentaram perfil de migração eletroforética bastante semelhantes (Figura 09). As massas moleculares foram estimadas tomando como referência as migrações dos heparans sulfatos C (9.300 Da) e D (4.500 Da), e Heparina (15.000 Da). Sendo assim, a massa calculada para as galactanas 1 e 2 foi de 6400 Da e 7400 Da, respectivamente.

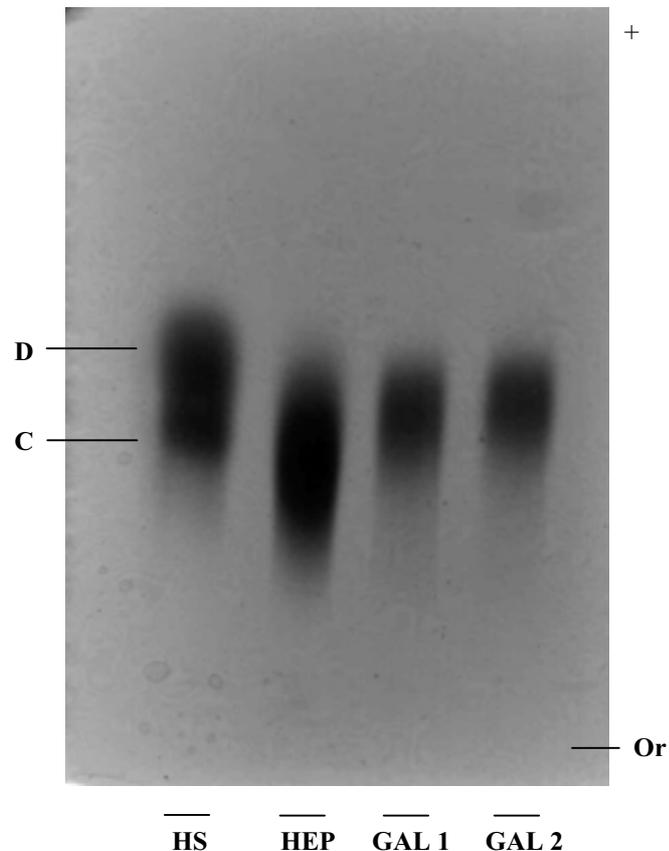


Figura 09. Eletroforese em gel de poliacrilamida das Gal 1 e Gal 2. Alíquotas de 20 μg da galactana 1 (Gal 1), da galactana 2 (Gal 2); heparam sulfato (C e D) e heparina (padrões de referência) foram aplicados em eletroforese em gel de poliacrilamida em tampão barbital 0.06 M, pH 8.6 e corados com azul de toluidina, conforme descrito em métodos. **Gal 1**, galactana 1; **Gal 2**, galactana 2; **HEP**, heparina de 15000 Da; **HS**, heparam sulfato; **C**, heparam sulfato de 9300 Da; **D**, heparam sulfato de 4500 Da; **Or**, origem.

3.8 – ANÁLISES QUÍMICAS DAS GAL 1 E GAL 2 OBTIDAS POR TROCA IÔNICA

As galactanas 1 e 2 obtidas na cromatografia de troca iônica foram submetidas as mesmas análises químicas que caracterizaram as frações cetônicas. A dosagem de açúcar total demonstrou que as Gal 1 e Gal 2 apresentaram 20,6 e 16,3 % de açúcar em sua composição (Tabela III). Nenhuma contaminação protéica foi verificada tanto para a Gal 1 como para a Gal 2. Após a cromatografia de troca

iônica foi possível verificar, através de cromatografia descendente em papel com os hidrolisados das frações (Gal 1 e 2), que dos monossacarídeos presentes na F 0,9 somente a galactose está presente nas Gal 1 e Gal 2 (Figura 10). Isso se deve provavelmente ao fato dos outros monossacarídeos (manose e arabinose) existentes anteriormente na F 0,9 serem neutros. Já com relação ao sulfato existente nestas galactanas, foi possível verificar que a Gal 1 apresentou 1,2 grupos sulfato para cada galactose em sua composição, enquanto a Gal 2 demonstrou a presença de 2,5 grupos sulfato para cada molécula de galactose. A Tabela III mostra as análises químicas da F 0,9, Gal 1 e Gal 2, bem como a sua composição e relação monossacarídica.

TABELA III
Análises químicas e relações molares dos açúcares e do sulfato presentes nas Gal 1 e Gal 2

Frações	Açúcar total %	Proteína %	SO ₃ Na %	Relações Molares			
				GAL ¹	MAN ¹	ARA ¹	SO ₃ Na
F 0.9	56,9	1,1	9,8	1	1,2	0,2	0,5
Gal 1	20,6	nd*	12,9	1	-	-	1,2
Gal 2	16,3	nd	22,1	1	-	-	2,5

¹ relação molar de açúcar, tendo a galactose como referência

* não detectado

GAL, galactose; **MAN**, manose; **ARA**, arabinose

3.9 – CROMATOGRAFIA EM PAPEL DESCENDENTE DAS GAL 1 E GAL 2

A análise qualitativa dos monossacarídeos constituintes das frações provenientes do fracionamento da troca iônica, após hidrolisadas, foi realizada em cromatografia descendente em papel, no sistema de solvente ácido isobutírico e amônia (ver métodos). Após revelação dos cromatogramas, observou-se a presença de somente uma banda, o que indica que as galactanas são constituídas de um mesmo monossacarídeo (Figura 10). Neste cromatograma não foi possível uma perfeita visualização do monossacarídeo constituinte das Gal 1 e 2, pois neste solvente, glicose e galactose migram de forma muito semelhante, porém, como já era sabido anteriormente, a F 0.9 não possuía glicose em sua composição, logo este monossacarídeo foi identificado como sendo galactose.

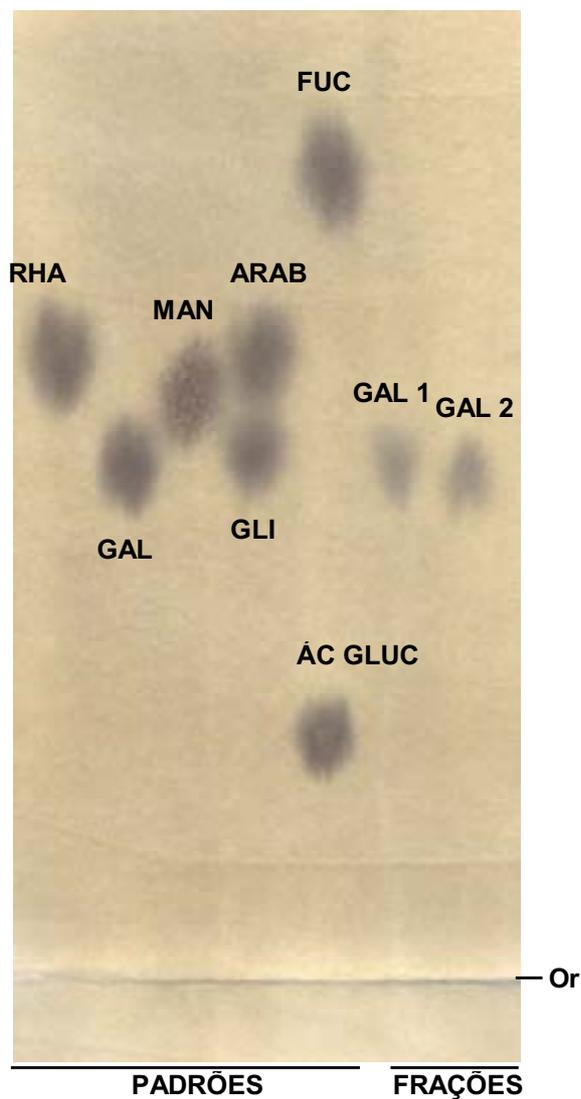


Figura 10. Cromatografia descendente em papel dos hidrolisados das Gal 1 e Gal 2 extraídas da alga *C. isthmocladum*. Alíquotas de cada galactana hidrolisada, foram aplicadas nas origens correspondentes, juntamente com os padrões de monossacarídeos e submetidos a cromatografia no solvente de ácido isobutírico: amônia (3:6). **Or**, origem; **FUC**, fucose; **ARAB**, arabinose; **GAL**, galactose; **MAN**, manose; **GLI**, glicose; **ÁC. GLUC**, ácido glucurônico, **RHA**, rhamnose.

3.10. – ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

As galactanas obtidas por troca iônica foram submetidas a espectroscopia de infravermelho segundo descrito em métodos. Os espectros da Gal 1 e Gal 2 foram bastante similares. O pico mais proeminente foi observado em 3448 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento O-H. Na região de $1068\text{-}1163\text{ cm}^{-1}$ (estiramento do hemiacetal), e 1258 cm^{-1} (estiramento assimétrico S=O) observa-se picos que indicam a presença de monossacarídeos sulfatados (dados não mostrados). Os dados mais relevantes foram observados na região entre $850\text{-}800\text{ cm}^{-1}$, essa região demonstra a presença de sulfato ligado aos carbonos C-4 e C-6 das galactanas. Um pico próximo de 845 cm^{-1} pode ser correlacionado com a presença de sulfato na posição axial do carbono C-4 da galactose em ambos espectros (Gal 1 e 2), no entanto apenas a Gal 2 possui um pico na região próxima a 820 cm^{-1} que pode ser correlacionado a sulfatação no carbono C-6 da galactose.

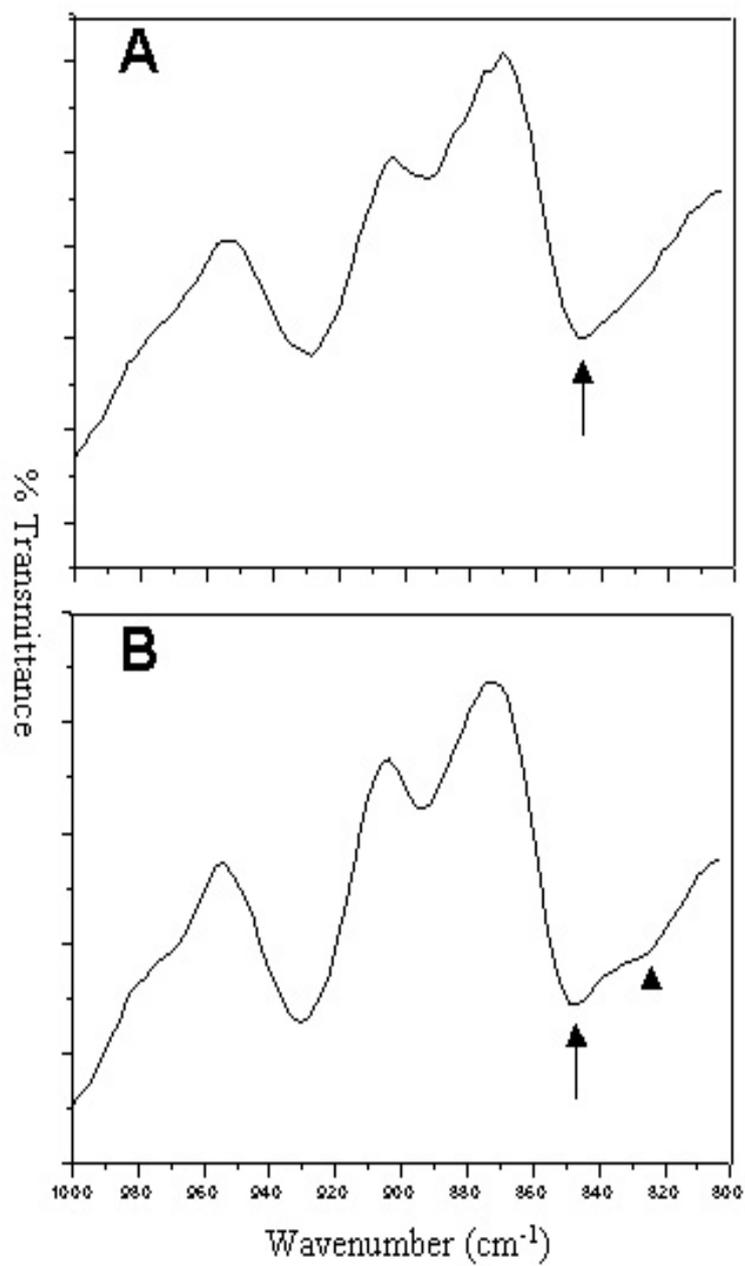


Figura 11. Espectros de infravermelho da região entre 1000 – 800 cm⁻¹ das Gal 1 e Gal 2. **A**, Gal 1. **B**, Gal 2. **Seta**, sulfatação no carbono C-4; **Ponta de seta**, sulfatação no carbono C-6.

3.11 – ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DAS GAL 1 E GAL 2

As galactanas 1 e 2, após análises químicas, foram submetidas a testes de atividade anticoagulante como descrito na metodologia, utilizando-se de “Kits” comerciais de aPTT (via intrínseca da coagulação) de PT (via extrínseca da coagulação).

Os resultados dos testes mostraram que as Gal 1 e 2 apresentaram atividade anticoagulante para o teste de aPTT (Tabela IV). Já com relação ao teste de PT não se verificou atividade anticoagulante. Analisando-se os dados obtidos para o aPPT, a Gal 1 apresentou uma atividade semelhante a heparina de baixo peso molecular (clexane®) conseguindo dobrar o tempo normal de coagulação com 6,3 µg. A Gal 2 se mostrou 9 vezes mais potente que a Gal 1, apresentando atividade anticoagulante semelhante a heparina não fracionada, dobrando o tempo normal de coagulação com apenas 0,7 µg. Os resultados dos testes de aPTT e PT, realizados com as galactanas (Gal 1 e Gal 2) da alga *C. isthmocladum*, comparados aos obtidos com a F 0.9 e as heparinas (não fracionada e clexane®) podem ser visualizados na Tabela IV.

TABELA IV
Atividade anticoagulante da F 0.9, Gal 1, Gal 2 e heparinas

Frações	aPTT *	PT *
F 0.9	8,1 ± 0,5 ¹	nd**
Gal 1	6,3 ± 1,9	nd
Gal 2	0,7 ± 0,3	nd
Heparina	0,8 ± 0,9	-
Clexane [®]	7,8 ± 2,7	75,0

* massa necessária (µg) para dobrar o tempo normal de coagulação; tempo controle aPTT e PT = 30,9 s e 17,2 s, respectivamente

** não detectado até 80µg

¹ desvio padrão (n=3)

3.12 – EFEITO DAS GAL 1 E GAL 2 NA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

As galactanas sulfatadas da alga *C. isthmocladum* foram submetidas a testes de agregação plaquetária, com intuito de se verificar o efeito destas nesse importante processo para a coagulação.

O ensaio de agregação plaquetária foi realizado de acordo com a descrição feita em materiais e métodos, e os resultados obtidos, demonstraram que apenas a galactana 2 apresentou efeito sobre a agregação plaquetária, porem esse efeito (pro-agregante) só foi verificado quando utilizadas altas doses do composto (250 µg). A Tabela V resume esses resultados.

Tabela V
Efeito das Gal 1 e Gal 2 na agregação plaquetária

Composto	Agregação plaquetária %			
	10µg	25µg	250µg	---
ADP (3 µM)				75,6 ± 4,5 ¹
Colágeno (5 µg/ mL)				84,5 ± 1,9
Gal 1	nd	nd	nd	
Gal 2	nd	nd	72,5 ± 3,0	

¹ desvio padrão (n=3)

4 – DISCUSSÃO

A alga *Codium isthmocladum* possui populações de polissacarídeos sulfatados, os quais foram divididos, através de extração (proteólise) e fracionamento com acetona, em cinco frações (F 0.3, F 0.5, F 0.7, F 0.9 e F 1.2), de acordo com o volume de acetona adicionado neste fracionamento. Devido à maneira como foram obtidas, como também, pela composição de açúcar em cada fração, podemos observar uma distribuição de diferentes populações de polissacarídeos sulfatados dentro destas cinco frações (ver Tabela I e Figura 07).

Já quando feita à relação entre a massa obtida para cada fração e o total extraído de todas as frações, observamos que, o rendimento percentual destas frações cetônicas se apresentou de forma bem uniforme, com exceção da fração F 1.2 que teve um rendimento inferior se comparado às outras frações (Figura 05). Estudos realizados com algas marrons (feofíceas) em nosso laboratório, utilizando a mesma metodologia, têm demonstrado um perfil de rendimento semelhante ao obtido com a alga *C. isthmocladum*, ou seja, a maior quantidade de material foi obtida com volumes menores de acetona. (Rocha, 1998; Silva, 1999; Alves, 2000; Queiroz, 2003). Uma comparação com dados obtidos de algas verdes por outros autores ficou prejudicada devido à descrição de metodologias de extração e purificação diferentes das descritas nesse trabalho e, portanto, se evitou relacionar os dados obtidos com aqueles relatados na literatura (Siddhanta *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000).

Os polissacarídeos extraídos de algas podem apresentar uma grande variação quando se diz respeito ao teor de contaminação protéica. Hussein *et al.* (1980), encontraram na alga marrom *Padina pavonia* fucanas com 67% de

contaminação protéica, enquanto Detrich *et al.* (1995), obtiveram 7,5% como o máximo teor de proteínas nas frações obtidas da *Padina gymnospora*. Esses dados demonstraram que esta contaminação pode variar de espécie para espécie e de acordo com o método da extração e fracionamento. Diferente da variação na quantidade de contaminantes protéicos observados nas algas marrons, análises realizadas em polissacarídeos obtidos de algas verdes tem mostrado uma baixa contaminação protéica (Siddhanta *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000). Em nosso trabalho, observaram-se resultados semelhantes para as frações cetônicas obtidas *C. isthmocladum*, nos quais se observa a baixa contaminação protéica (mínimo de 0,5 % e máximo de 3,2 %) (Tabela I). Após revisão bibliográfica não foram identificados trabalhos que relatassem alto teor de contaminação protéica em polissacarídeos sulfatados de algas verdes, o que indica que as diferentes metodologias utilizadas na extração e fracionamento desses polissacarídeos são eficazes para evitar que as frações obtidas dessas algas estejam altamente contaminadas com proteínas. Contudo, há alguns relatos interessantes sobre a presença de proteína em algas verdes. Matsubara *et al.* (2000) relatam a presença de uma galactoarabinoglucana sulfatada contendo 5,2% de contaminação protéica na alga *Codium pungiformis*. Baseados nesses dados os autores afirmaram que esse composto era um proteoglicano.

Com relação à dosagem de açúcar total nas frações cetônicas, foi possível observar que as F 0.5, F 0.7 e F 0.9 demonstraram maior quantidade de polissacarídeos (Tabela I). Resultados semelhantes foram obtidos em nosso laboratório, utilizando a mesma metodologia, com as algas *Spatoglossum schöederi* e *Sargassum vulgare* (Rocha, 1998; Alves, 2000), em que as primeiras frações são as possuidoras de maior quantidade de polissacarídeos, com exceção da fração

F 0.3, o que indica que, devido à metodologia empregada, esta fração possui um alto teor de contaminantes e conseqüente baixa quantidade de açúcar.

Segundo Hayakawa *et al.* (2000), quatro espécies do gênero *Codium* e duas espécies do gênero *Caulerpa* apresentaram polissacarídeos pouco sulfatados (no Maximo 0,7 % de sulfato). Em contrapartida, frações de polissacarídeos altamente sulfatados foram obtidas da *Codium dwarkense* (no mínimo 26,04 % de sulfato), segundo Siddhanta *et al.* (1999). Os dados acima descritos mostram que na literatura é possível encontrar algas verdes com quantidades variadas na sulfatação dos polissacarídeos delas obtidos. Na alga *C. isthmocladum*, material biológico de nosso estudo, pode-se observar a presença de sulfato em todas as frações cetônicas e se esses dados (Tabela I) forem transformados para percentagem, obtemos um teor de sulfato variando entre 2,9 e 12,3 %. Estes resultados obtidos se localizam em uma faixa intermediária de sulfatação se comparado com os outros trabalhos acima citados, o que indica que o grau de sulfatação pode variar devido a diversos fatores como: metodologia de extração e fracionamento, quantidade de frações obtidas e principalmente, como nesse trabalho, com relação à espécie estudada.

A análise da presença de polissacarídeos sulfatados foi confirmada através da utilização da técnica de eletroforese em gel de agarose. O perfil da migração eletroforética de polissacarídeos sulfatados em tampão PDA depende da estrutura do polissacarídeo, pois este forma um complexo com este tampão (Dietrich *et al.*, 1977). Logo, quando se verifica a presença de bandas eletroforéticas em diferentes frações, mas com migrações semelhantes é um indicativo de que, estas bandas podem representar a mesma população de polissacarídeos.

Foi possível observar, em nossos resultados, a presença de diferentes bandas eletroforéticas nas frações cetônicas obtidas, o que indica a presença de diferentes populações de polissacarídeos decorrentes do fracionamento com volumes crescentes com acetona (Figura 07). A F 0.5, por exemplo, apresenta na sua composição diferentes populações de polissacarídeos sulfatados, o que pode ser confirmado pelo seu perfil eletroforético. Não só a presença de diferentes populações de açúcares na mesma fração cetônica, mas também, a presença da mesma população em mais de uma fração pode ser observada após revelação da lâmina eletroforética (Figura 07). Siddhanta *et al.* (1999) conseguiram obter, através de cromatografia de troca iônica, diferentes frações de polissacarídeos sulfatados com composição glicídica distintas entre si. Nesse trabalho verificou-se a presença de três monossacarídeos predominantes, que se distribuíram de forma diferente, em todas as frações cetônicas (Figura 06), o que corrobora com dados da literatura em que as algas verdes apresentam mais de um tipo de polissacarídeos sulfatado na sua composição.

Todas as frações cetônicas obtidas da alga *C. isthmocladum* apresentaram atividade anticoagulante, quando desafiadas a testes de aPTT. No entanto, nenhuma delas apresentou atividade anticoagulante para o teste de PT (Tabela II). O fato de todas as frações se mostrarem como anticoagulantes para o teste de aPTT, e nenhuma destas indicarem atividade anticoagulante, nas concentrações utilizadas, para o teste de PT, sugere que esses polissacarídeos sulfatados possuem seu(s) alvo(s) moleculares(s) na via intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação. A F 0.9 foi a fração que apresentou melhor atividade anticoagulante, seguida de perto pela F 0.3 (Tabela II). Porém diferente da F 0.3, a F 0.9 apresentou somente uma banda eletroforética (Figura 07), indicando a existência de uma só

população de polissacarídeos sulfatados, fazendo com que a F 0.9 fosse escolhida para passos posteriores de purificação.

Com a realização de uma cromatografia de troca iônica com a F 0.9, esta fração foi subdividida em duas frações (2,0 e 3,0 M de NaCl) o que pode ser confirmado por eletroforese em gel de agarose (Figura 08).

Através de cromatografia descendente em papel, realizada com o hidrolisados das frações 2,0 e 3,0 M de NaCl obtidas por troca iônica, foi possível confirmar que estas possuíam somente galactose em sua composição (Figura 10), levando-nos a denominar estas frações de galactana 1 (Gal 1) e galactana 2 (Gal 2). Até então, na literatura, só havia sido descrito o isolamento de heterogalactanas em algas verdes, logo esta é a primeira vez em que homogalactanas são isoladas dessas macroalgas.

Análises químicas realizadas com a Gal 1 e com a Gal 2 revelaram que estas estão livres de contaminação protéica e que a Gal 2 é mais sulfatada que a Gal 1 (Tabela III). No entanto, ao analisar os espectros de infravermelho das duas galactanas, observa-se que elas apresentam bandas de absorção similares, o que indica que as homogalactanas são o mesmo composto com diferente grau de sulfatação (Figura 11).

Como era de se esperar, nenhuma das galactanas apresentou atividade anticoagulante quando submetidas a testes de PT. Com relação o teste de aPTT, a Gal 2 se mostrou 9 vezes mais potente que a Clexane® ou que a Gal 1 (Tabela IV). Este resultado foi surpreendente considerando a pequena diferença na relação molar de sulfato entre as Gal 1 e 2 (Tabela III), indicando que o grau de sulfatação não é o parâmetro mais importante para se distinguir galactanas mais potentes como compostos anticoagulantes. Logo, as posições destes grupamentos sulfato nas Gal

1 e Gal 2 estariam, provavelmente, influenciando de forma decisiva para a diferença na atividade anticoagulante apresentadas por elas.

Essa alta atividade da Gal 2 pode ser explicada pela presença de sulfatação em C-6, que não está presente em Gal 1 (Figura 11). Em trabalho realizado por Melo *et al.* (2004) foram comparadas homogalactanas sulfatadas de invertebrados marinhos e da alga vermelha *Botryocladia occidentalis*. Eles mostraram que galactanas que possuem um terço dos resíduos de galactose 2,3-di-O-sulfatada apresentam uma atividade anticoagulante semelhante a heparina (não fracionada), no entanto, outra galactana que possui sulfato na posição no carbono C-2 ou C-3 e não nos dois ao mesmo tempo apresenta uma baixa atividade anticoagulante. Em complemento a isso, foi mostrado em outro trabalho, que tanto a dupla sulfatação em C-2/C-3, ou em C-4/C-6 parecem ser necessárias para galactanas apresentarem atividade anticoagulante (Chaidedgumjorn *et al.*, 2002). As análises de infravermelho realizadas em nosso trabalho mostraram a presença de regiões de sulfato ligado ao carbono C-4 e C-6 na galactana 2 (Figura 11), que possivelmente conferiram a esta galactana sua potente atividade anticoagulante, porém são necessários estudos mais detalhados sobre sua estrutura para confirmar a presença ou não de galactose di-sulfatadas.

Tendo em vista que o processo de coagulação sanguínea abrange muitos outros mecanismos além da formação do trombo propriamente dito, como por exemplo, a agregação plaquetária, este trabalho tentou verificar o efeito destas galactanas sobre este mecanismo.

A galactana sulfatada 1 não induziu efeito sobre a agregação plaquetária nas concentrações utilizadas. Já a galactana sulfatada 2 em altas doses induziu a agregação plaquetária (Tabela V). Esse mesmo efeito, no qual galactanas

anticoagulantes em altas concentrações promovem a agregação de plaquetas já foi relatado anteriormente para carragenanas (Kindness *et al.*, 1979) e homogalactanas de alga vermelha (Farias *et al.*, 2000). No entanto, é necessário mais estudos relacionados ao mecanismo de ação da Gal 2 na agregação plaquetária para ser possível qualquer tipo de “colocação”, acerca destes resultados. Além disso, o mecanismo de ação de que as galactanas (acima descritas) utilizam para produzir esse efeito sobre a agregação plaquetária ainda não é bem conhecido.

Por fim, estudos adicionais estão sendo realizados na tentativa de elucidar a relação entre a estrutura e atividade anticoagulante das homogalactanas sulfatadas da alga *Codium isthmocladum*, os quais, certamente, ajudarão no desenvolvimento de um novo agente anticoagulante.

5 – CONCLUSÕES

Através do fracionamento com volumes crescentes de acetona foram obtidas as seguintes frações cetônicas: F 0.3, F 0.5, F 0.7, F 0.9, F 1.2, as quais se mostraram constituídas por polissacarídeos sulfatados;

A fração cetônica que apresentou o melhor rendimento foi a F 0.7, com cerca de 28% do total do material extraído;

As análises químicas demonstraram que todas as frações cetônicas apresentaram galactose, manose, arabinose, traços de xilose e baixa contaminação protéica em sua composição;

Nenhuma das frações polissacarídicas obtidas apresentou atividade anticoagulante mensurável (até 80 µg) por testes de PT. O que indica que nenhuma delas possui alvo(s) molecular(es) na via extrínseca da coagulação;

Foram encontradas atividades anticoagulantes pelo teste de aPTT, para todas as frações polissacarídicas provenientes da alga *C. Isthmocladium*, o que indica que esses polissacarídeos anticoagulantes possuem alvo(s) molecular(es) localizados na via intrínseca e/ou comum da coagulação;

A fração F 0.9 da *C. isthmocladium* foi a fração cetônica que apresentou a maior atividade anticoagulante, dobrando o tempo normal de coagulação com 8,1 µg;

Através de cromatografia de troca iônica a F 0.9 foi subdividida em duas novas frações denominadas de: galactana 1 (Gal 1) e galactana 2 (Gal 2);

As massas moleculares da Gal 1 e da Gal 2 são 6,4 e 7,4 kDa, respectivamente;

As Gal 1 e 2 são homogalactanas, ou seja, possuem somente galactose como monossacarídeo constituinte;

Este é o primeiro relato de homogalactanas sulfatadas anticoagulantes encontradas em algas verdes.

Análises de infravermelho indicaram que as Gal 1 e Gal 2 são o mesmo composto, tendo apenas como diferença grau e localização dos grupamentos sulfato;

As galactanas sulfatadas da alga *C. isthmocladum* não demonstraram atividade anticoagulante através de testes de PT, porém quando submetidas a testes de aPTT elas se apresentaram como anticoagulantes;

A galactana 2 apresentou atividade similar a heparina não fracionada, dobrando o tempo de aPTT com apenas 0,7 μ g e 9 vezes mais potente que a Gal 1;

A Gal 2 induz agregação plaquetária, porém esse efeito só foi verificado em altas concentrações.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, I.R.L.; QUEIROZ, K.C.S.; ALVES, L.G.; SANTOS, E.A.; Leite, E.L. ROCHA, H.A.O. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Braz J Med Biol Res.**, Volume 37(2): 167-171, 2004.

ALVES, L.G. **Polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha *Sargassum vulgare***. 2000. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2000.

AQUINO R. S.; LANDEIRA-FERNANDEZ A. M.; VALENTE A. P.; ANDRADE L. R.; MOURÃO P. A. S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, 15(1):11-20, 2005

BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, 13: 29R-40R, 2003.

BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C; FISCHER, A.M.; AGOSTINI, A.; JOZEFONVICZ J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs of the Future**, 20: 1237-1249, 1995.

BORN, G,V,Platelet pharmacology in relation to thrombosis. *Adv Cardiol.* 4:161-74, 1970.

CHAIDEDGUMJORN, A.; TOYODA, H.; WOO, E.R.; LEE, K.B.; KIM, Y.S.; TOIDA, T.; IMANARI, T. Effect of (1-->3)- and (1-->4)-linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity. **Carbohydr. Res.**,337(10):925-33. 2002.

CHARGAFF, E.; BRANCROFT, F.W.; STANLEY-BROWN, M. Studies on the chemistry of blood coagulation II. On the inhibition of blood clotting by substances of high molecular weight. **J. Biol. Chem.**, 115: 155-161, 1936.

DAVIE E.W. & RATNOFF O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science** 145: 1310-1312, 1964.

DEACON-SMITH RA, LEE-POTTER JP, ROGERS DJ. Platelet aggregation in the presence of extracts of British marine algae. **Med Lab Sci.**, 42(4):404-5. 1985.

- DIETRICH, C.P.; FARIAS, G.G.M.; ABREU, L.R.D.; LEITE, E.L.; SILVA, L.F.; NADER, H.B.A. A new approach for characterization of polysaccharides from algae: presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Sci.**, 108: 143-153, 1995.
- DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M.C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. **J. Chromatogr.**, 130: 299-304, 1977.
- DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissue. Isolation and partial characterization of a homogeneous species of heparitin sulfate. **Biochem. Biophys. Acta**, 343: 34-44, 1974.
- DODGSON, K.S. & PRICE, R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J.**, 84: 106-110, 1962.
- DÜRIG, J.; BRUHN, T.; ZURBORN, K.; GUTENSOHN, K.; BRUHN, H.D.; LÁSZLÓ B. Anticoagulant fucoidan fractions from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation in vitro. **Thrombosis Research**, 85(6): 479-491, 1997.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Anal. Chem.**, 28: 350-356, 1956.
- FABRIS, F.; LUZZATTO, G.; STEFANI, P.M.; GIROLAMI, B.; CELLA, G.; GIROLAMI, A. Heparin-induced thrombocytopenia. **Haematologica**, 85: 72-81, 2000.
- FAREED J.W.; HOPPENSTEADT & BICK R. L. An update of heparins at the beginning of the new millennium. **Semin. in Thromb. and Hemost.**, 26: 5-21, 2000.
- 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 algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **J. Biol. Chem.**, 38: 29299-29307, 2000.
- FARIAS, G.G.M. **Uma nova abordagem para o estudo comparativo dos polissacarídeos ácido de algas: classe Phaeophyceae.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, Natal, 1992.

- FRANCO, R.F. **Fisiologia Da Coagulação, Anticoagulação E Fibrinólise**. Simpósio: hemostasia e trombose - Ribeirão Preto, 229-237, jul./dez. Capítulo1. 2001.
- GANONG, W. F. **Fisologia médica**. Tradução Sidney A. Câmara. 2ª ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo S.A., 1973.
- HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J. B.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAWA, N. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Bioch. Bioph. Acta**, 1543: 86-94, 2000.
- HIRSH, J. New anticoagulants. **Am. Heart J.**, 142: 3-8, 2001.
- HUSSEIM, M.; MAGDEL-DIN; ABDEL-AZIZ, A.; SALEM, H.M. Some structural features of a new sulphated heteropolysaccharide from *Padina pavonia*. **Phytochem**, 19: 2133-2135, 1980.
- JURD, K.M.; ROGERS, D.J.; BLUNDEN, G.; MCLELLAN, D.S. Anticoagulant properties of sulfated polysaccharides and a proteoglycan from *Codium fragile ssp.* **J. appl. Phycol**, 1995.
- KINDNESS, G.; LONG, W.F.; WILLIAMSON, F.B.; BOYD, J. Effects of carragenans on the aggregation of human blood platelets. **J Throm Res**, 15(1-2):3-15, 1979.
- LINKINS. LA; WEITZ. JI. New anticoagulants. **Semin Thromb Hemost**, 29(6):619-31, 2003.
- HAROUN-BOUHEDJA, F.; MOSTAFA, E.; SINQUIN, C; BOISSON-VIDAL, C. Relation between sulfate groups and biological activities of fucans. **Thromb. Res.**, 100: 453-459, 2000.
- LAHAYE M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **J. Appl. Phycol.**, 13: 173–184, 2001.
- MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, 202: 498-499, 1964.
- MATSUBARA, K. Recent advances in marine algal anticoagulants. **Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents**, 2(1):13-9, 2004.

- MATSUBARA, K.; MATSUURA Y.; BACIC A.; LIAO M.; HORI K.; MIYAZAWA K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **Int J Biol Macromol.**, 28(5): 395-9, 2001.
- MATSUBARA K, HORI K, MATSUURA Y, MIYAZAWA K. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codium divaricatum*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** 125(1):137-43. 2000.
- McLEAN J. The discovery of heparin. **Circulation.**, 19(1):75-8, 1959.
- MELO, F.R.; PEREIRA, M.S.; FOGUEL, D.; MOURAO, P.A. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides: different mechanisms for heparin and sulfated galactans. **J Biol Chem.**, 279(20): 20824-35. Epub 2004 Mar 2. 2004.
- NADER, H.B., LOPES, C.C., ROCHA, H.A.O, SANTOS, E.A, DIETRICH, C.P. Heparins and heparinoids: occurrence, structure, and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Current Pharmac. Design**, 10: 951-66, 2004.
- NADER, H.B.; PINHAL M.A.; BAU E.C.; CASTRO R.A.; MEDEIROS G.F.; CHAVANTE S.F.; LEITE E.L.; TRINDADE E.S.; SHINJO S.K.; ROCHA H.A.; TERSARIOL I.L.; MENDES A.; DIETRICH C.P. Developmento of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34: 669-709, 2001.
- NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; STRAUS A.H.; TAKAHASHI, H.K. Physico-chemical characteristics of heparin in relation to its anticoagulant and anti-hemostatic action. **Rev. Bras. Biol.**, 39: 793-816, 1979.
- NATIONAL VITAL STATISTICS REPORTS. 51:4-9, 2003.
- NISHINO, T.; NISKIOKA, C.; URA, U.; NAGUNO, T. - Isoalation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfated from comercial *Fucus vesiculosus*. **Carbohydr. Res.**, 255: 213-224, 1994.
- PEREIRA, M.G., BENEVIDES, N.M., MELO, M.R., VALENTE, A.P., MELO, F.R., MOURAO P.A., Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydr Res.**, 340(12): 2015-23. 2005.

- PEREIRA, M.S., VILELA-SILVA, A.C., VALENTE, A.P., MOURAO, P.A. A 2-sulfated, 3-linked alpha-L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. **Carbohydr Res.**, 337(21-23): 2231-8. 2002.
- PEREIRA, M.S., MELO, F.R., MOURAO, P.A. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans?. **Glycobiology.** 12(10): 573-80. 2002a.
- QUEIROZ, K. C. S. **Estudos de polissacarídeos bioativos da alga marrom *Lobophora variegata***. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2003.
- ROCHA, H. A. O., BEZERRA, L. C., ALBUQUERQUE, I.R.L, COSTA, L.S., GUERRA, C.M., ABREU, L.D., NADER, H.B., LEITE, E.L. A xylogalactofucan from the brown seaweed *spatoglossum schroederi* stimulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial. **Planta Med.**, 71(4): 379-81. 2005a.
- ROCHA, H.A.; MORAES, F.A.; TRINDADE, E.S.; FRANCO, C.R.; TORQUATO, R.J.; VEIGA, S.S.; VALENTE, A.P.; MOURAO, P.A.; LEITE, E.L.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent?. **J Biol Chem.** 280(50):41278-88. 2005b.
- ROCHA, H. A. O. **Extração e purificação de uma fucana da alga marinha *Spatoglossum schröderi***. Dissertação de Mestrado em Bioquímica - Universidade Federal de São Paulo. São Paulo-SP, 1998.
- SIDDHANTA, A.K., SHANMUGAM, M., MODY, K.H., GOSWAMI, A.M., RAMAVAT, B.K. Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. from the west coast of India: chemical composition and blood anticoagulant activity. **Int J Biol Macromol.**, 26(2-3): 151-4. 1999.
- SILVA, T.M., ALVES, L.G., QUEIROZ, K.C., SANTOS, M.G., MARQUES, C.T., CHAVANTE, S.F., ROCHA, H.A., LEITE, E.L. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Braz J Med Biol Res.**, 38(4): 523-33, 2005.
- SILVA, T. M. A. **Extração de polissacarídeos sulfatados e caracterização de uma fucana da alga marinha marrom *Padina gymnospora***. 1999. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 1999.

SIMÃO, M. **Fatores de risco para as doenças cardiovasculares em trabalhadores de uma destilaria do interior paulista**. 2001(Dissertação) Universidade De São Paulo, Ribeirão Preto.

SPECTOR, J. Refinement of the coomassie blue method of protein qualification. A simple and linear spectrophotometric assay of 0.5 to 50 μg of protein. **Anal. Biochem.**, 86: 142-146, 1978.

TAVARES, A. Polimorfismo dos genes do sistema renina-angiotenseina-aldosteron e moléstias cardiovasculares. **Ver. Brás. Hipertens**, 7(3), 237-242, 2000.

VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. **Biochim. Biophys. Acta**, 257: 11-19, 1972.