

Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante

HUGO A. O. ROCHA¹; EDUARDO H. C. FARIAS²; LUANA C. L. M. BEZERRA³
IVAN R. L. ALBUQUERQUE³; VALQUÍRIA P. MEDEIROS⁴; KARLA C. S. QUEIROZ⁵; EDDA L. LEITE⁶.

1. Farmacêutico, Prof. Adjunto I do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN.
2. Graduando do 5º Período do Curso de Ciências Biológicas da UFRN.
3. Mestrando em Bioquímica - UFRN
4. Bióloga, mestre em Bioquímica.
5. Farmacêutica, docente da disciplina de Farmacologia - UFRN.
6. Farmacêutica, Prof. Adjunto IV - Departamento de Bioquímica - UFRN.
Autor responsável - e-mail hugo-alexandre@uol.com.br

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares estão intimamente relacionadas a trombose. Elas têm, nos Estados Unidos, uma incidência duas vezes maior de mortes do que a segunda causa de morte, o câncer (Nader

et al., 2001). Mesmo quando as doenças cardiovasculares não são mortais, essas levam, com grande frequência, à invalidez parcial ou total, com graves repercussões para o paciente, sua família e a sociedade.

A incidência de doenças cardiovasculares vem

umentando consideravelmente nos últimos anos, não só nos países desenvolvidos, mas principalmente nos do terceiro mundo, pois está, na maioria dos casos, relacionada com várias características do modo de vida dos habitantes de países desenvolvidos, como: sedentarismo, hábitos alimentares, "stress", dentre outros.

O enorme avanço tecnológico no diagnóstico, tratamento e prevenção das doenças cardiovasculares tornou disponível o uso de novas técnicas, tais como ultra-sonografia, cineangiocoronariografia, revascularização miocárdica, tomografia computadorizada e outras. Novos compostos têm sido também avaliados, tanto na prevenção como no tratamento de patologias cardiovasculares.

No início da década de 90, eram conhecidos apenas três fármacos anticoagulantes: heparina, aspirina e varfarina. Atualmente, há três novos compostos aprovados como anticoagulantes pelo FDA e mais cinco em fase III de estudos. Entretanto, esses fármacos, devido aos seus mecanismos de ação, apresentam uso restrito a poucas patologias (Hirsh, 2001) e, por isso, não substituem, em muitos casos, o mais antigo anticoagulante em uso: a heparina.

A heparina é um polissacarídeo sulfatado (uma mucilagem) de origem animal, foi o primeiro fármaco utilizado como anticoagulante e, depois de 60 anos, ainda continua sendo o anticoagulante mais utilizado devido ao fato de possuir vários sítios de ação. Ela é principalmente usada na prevenção de trombose venosa profunda em pós-cirurgias e pós-parto, em pacientes com estado de hipercoagulopatia, ou sujeito à trombose causada por diferentes etiologias (Weitz, 1994).

Entretanto, a heparina pode apresentar algumas reações adversas indesejáveis. Em alguns pacientes, observa-se o aparecimento de trombocitopenia (Fabris et al., 2000). Outro problema observado foi o efeito hemorrágico residual da heparina, apresentado mesmo por fragmentos de heparina que não possuem atividade anticoagulante (Nader et al., 1979).

Além disto, a heparina é obtida, principalmente, de intestino suíno ou bovino, o que pode trazer risco de contaminação aos pacientes por partículas virais ou outros agentes, como prions causadores da encefalopatia espongiforme (mais conhecida como mal da vaca louca).

Devido a esses fatores, a busca de compostos que possam agir como anticoagulantes vem se intensificando. Uma das principais frentes de pesquisa é a identificação de polissacarídeos sulfatados que possuam atividade anticoagulante (Mulloy et al., 2000). Nesse grupo de compostos, há uma grande possibilidade de se encontrar moléculas que possam substituir o polissacarídeo heparina. Dentre os polissacarídeos, destacam-se os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.

As algas marinhas são organismos filogenéti-

camente distantes dos mamíferos, portanto o risco por contaminação por partículas virais é mínimo. Elas podem ser divididas em três grandes grupos: as algas verdes; marrons e as vermelhas. Elas são os únicos vegetais conhecidos que apresentam polissacarídeos sulfatados em sua composição.

Nas algas vermelhas, encontram-se as galactanas sulfatadas. A atividade anticoagulante para esses compostos foi inicialmente descrita por Chargaf e col., 1936, e, atualmente, vários pesquisadores têm se interessado por galactanas de algas. Das algas marrons extrai-se as fucanas (homofucanas) e os fucoidans (heterofucanas), elas são polissacarídeos constituídos principalmente de L-fucose sulfatada, contudo outros monossacarídeos podem ser encontrados e atualmente são os polissacarídeos de origem vegetal mais bem estudados com relação à atividade anticoagulante (Boisson-Vidal et al., 1995; Düring et al., 1997; Haroun-Bouhedja et al., 2000). As algas verdes apresentam polissacarídeos sulfatados mais heterogêneos que são ricos em galactose, manose, xilose, arabinose, glicose e ou ácidos urônicos (Chevolot et al., 2001).

Estudos com polissacarídeos sulfatados de algas têm demonstrado que suas estruturas variam de espécies para espécies e, às vezes, em diferentes partes da mesma planta (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.

E, assim, cada polissacarídeo pode possuir conformação estrutural única e, portanto, apresentar atividades anticoagulantes diferentes e ou mais potentes de que outros polissacarídeos ou outros compostos já descritos. Deste modo, a identificação de um novo polissacarídeo sulfatado vem sempre acompanhada de perspectivas de descobertas de um novo fármaco a ser utilizado pela indústria farmacêutica.

Apesar do potencial farmacológico dos polissacarídeos de algas, da diversidade de espécies de algas e, conseqüentemente, da quantidade de polissacarídeos sulfatados nelas encontrados, poucos estudos foram realizados com esses compostos. Neste trabalho, descreve-se a extração, caracterização química e verificação da atividade anticoagulante dos polissacarídeos de duas espécies de algas marrons encontradas no litoral do Rio Grande do Norte.

MATERIAL E MÉTODOS

Algas: as espécies de algas utilizadas nesse estudo foram coletadas na praia de Búzios (RN). A escolha foi feita, utilizando-se os seguintes critérios: abundância da alga, facilidade de obtenção, e não ter sido uma espécie que teve seus polissacarídeos estudados como anticoagulantes. As espécies esco-

Ihidas foram *Spatoglossum schröderi* e *Dictyota menstrualis*.

Obtenção dos polissacarídeos sulfatados:

Após a coleta, as algas foram secas em estufa a 45°C, trituradas e submetidas à maceração com acetona PA, durante 24 horas, para retirada de contaminantes lipídicos e polifenólicos. O material obtido após esse processo, denominado de pó cetônico, foi submetido à extração das frações polissacarídicas como descrito em ROCHA, 2002.

O pó cetônico foi submetido a uma proteólise por 12h a 60°C (maxatase) para aumentar a solubilidade dos polissacarídeos sulfatados. Posteriormente, o material foi centrifugado (10000g) e o sobrenadante obtido após a proteólise foi fracionado com o acréscimo de volumes crescentes de acetona. Inicialmente, foram adicionados 0,5 volumes de acetona (Merck) a solução, que foi mantida a 4°C durante 18h.

O precipitado foi coletado por centrifugação a 10.000 x g por 10 min., seco a pressão reduzida. Ao sobrenadante foi adicionada acetona para uma concentração final de 0,6 volumes que foi mantido a 4°C durante 18h. Esse procedimento foi repetido usando-se concentrações crescentes de acetona. Assim, foram obtidas diferentes frações polissacarídicas.

Quantificação dos polissacarídeos e proteínas: Para se verificar a quantidade de polissacarídeos nas frações extraídas das algas foi realizado a determinação de açúcares totais pelo método do fenol/ácido sulfúrico (Dubois et al. 1956), empregando-se como padrão L-fucose, D-galactose ou D-glicose, sendo as leituras realizadas a 490 nm ou 480nm. O grau de contaminação protéica foi determinado com o reagente Comassie blue R (Spector 1978) e a leitura realizada a 595nm.

Quantificação de sulfato: O sulfato total das frações polissacarídicas foi medido após hidrólise ácida (HCl 8N, 6 horas, 100°C) e quantificado por tur-

bidimetria pelo método da gelatina-bário (Dodgson & Price, 1962). Sulfato de sódio (1,0 mg/ml) foi empregado como padrão.

Atividade anticoagulante: Os ensaios de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT) foram realizados, seguindo o protocolo fornecido pelos "kits" comerciais adquiridos (Labtest).

Eletroforese em gel de agarose: foi realizado como descrito em Melo & Sousa F°, 2002.

RESULTADOS

Para se verificar a presença de fucanas em *Spatoglossum schröderi* e *Dictyota menstrualis*, essas algas passaram por um tratamento inicial como descrito em métodos e, após a proteólise, obtiveram-se extratos ricos em polissacarídeos que foram submetidos à precipitação com o acréscimo de vários volumes de acetona.

Os extratos obtidos das duas algas avaliadas apresentaram material precipitado em todas as frações. A presença de polissacarídeos sulfatados e, conseqüentemente, de fucanas nas dessas frações obtidas com a precipitação cetônica foi verificada através de análises químicas com relação à presença de açúcar, sulfato, fucose e proteína como descrito em métodos. O resultado das análises está resumido na tabela 1.

As análises químicas indicaram a presença de polissacarídeos em todas as frações, sendo que as frações precipitadas com volumes menores apresentaram-se com um percentual maior de polissacarídeos (açúcares totais). A determinação de fucose e sulfato nas frações indicou a possível presença de fucanas em todas as frações. O grau de contaminação protéica foi baixo, variando em torno de 0,7 e 5,3%, o que indicou a importância da degradação das proteínas através da utilização da enzima proteolítica maxatase.

TABELA 1. Análises químicas das frações polissacarídicas obtidas das algas *S. schröderi* e *D. menstrualis*

Frações de <i>S. schröderi</i>	Relação molar Fucose/ SO ₃ Na	Açúcares totais (%)	Proteína (%)
F0.5v	0,79	16,0	5,3
F0.6v	0,78	28,9	1,0
F0.7v	0,59	23,2	1,6
F0.9v	0,33	17,8	3,6
F1.1v	0,45	28,8	2,0
F1.3v	0,36	13,6	4,4
F2.0v	0,45	15,3	4,0
Frações de <i>D. menstrualis</i>			
F0.5v	25	19,0	3,5
F1.0v	2,5	28,7	2,3
F1.5v	0,77	15,8	2,0
F2.0v	0,91	14,2	1,0
F3.0v	0,83	10,9	0,7

Os constituintes sulfatados das frações polissacarídicas foram visualizados, após serem submetidos a uma eletroforese em gel de agarose em tampão PDA (1,3 diamino propano acetato) e corados com azul de toluidina. A figura 1 mostra as lâminas obtidas com esse procedimento. Verifica-se que muitas frações são constituídas de duas populações de fucanas, as exceções são as frações 0.9v e 2.0v de *S. schröderi* e 2.0v e 3.0v de *D. menstrualis*.

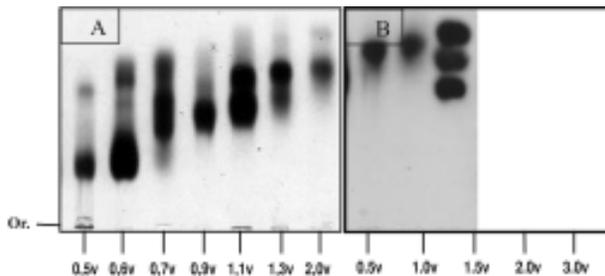


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA dos polissacarídeos ácidos extraídos da alga *S. schröderi* e *D. menstrualis*.

Frações obtidas a partir do extrato bruto utilizando-se acréscimo de diferentes volumes acetona,

como descrito em métodos. Cerca de 50mg de cada fração foram submetidos à eletroforese em gel de agarose em tampão PDA 0,05M, pH 9,0. A visualização dos polissacarídeos foi feita com azul de toluidina.

A – Polissacarídeos ácidos da alga *Spatoglossum schröderi*.

B - Polissacarídeos ácidos da alga *Dictyota menstrualis*.

Or. – origem; **v** - volume.

Como todas as frações obtidas das algas apresentaram fucanas na sua constituição, essas frações foram então analisadas como anticoagulantes. Volumes das frações com diversas concentrações de fucanas (mg/mL) foram postos em frascos e liofilizados. Posteriormente, acrescentou-se o plasma e os demais reagentes para se fazer o teste de APTT.

Os dados obtidos (Tabela 2) com as fucanas de *S. schröderi* demonstraram que essas fucanas, mesmo as mais sulfatadas, como 0.9v e 1.3v, não apresentaram atividade anticoagulante nas concentrações avaliadas. Entretanto, as fucanas das frações 1.0v e 1.5v de *D. menstrualis* apresentaram atividade anticoagulante considerável.

Tabela 2. Atividade anticoagulante das frações de fucanas obtidas das algas *S. schröderi* e *D. menstrualis*

Frações de <i>S. schröderi</i>	APTT *
F0.5v	nd
F0.6v	nd
F0.7v	nd
F0.9v	nd
F1.1v	nd
F1.3v	nd
F2.0v	nd
Frações de <i>D. menstrualis</i>	
F0.5v	nd
F1.0v	20,0
F1.5v	80,0
F2.0v	nd
F3.0v	nd

* Concentração (µg/µL) necessária para dobrar o APTT
nd - não determinado até uma concentração de 200µg/µL

DISCUSSÃO

Utilizando uma metodologia simples, desenvolvida em nosso laboratório (Rocha, 2002), conseguiu-se extrair e fracionar polissacarídeos sulfa-

tados das algas marrons *S. schröderi* e *D. menstrualis*. As análises químicas demonstraram que cada fração é constituída por quantidades diferentes de fucose e sulfato (tabela 1). Estes dados em conjunto com as eletroforeses indicaram que as

frações são constituídas por uma ou mais fucanas. A presença de fucanas em algas marron foi demonstrada inicialmente por Kylim 1913 e frequentemente tem se mostrado a presença de mais de uma fucana numa mesma alga marron (Nishino et al., 2000, Duarte et al., 2001).

A análise para detecção de contaminantes protéicos demonstrou que as frações obtidas apresentaram baixo teor de contaminação (máximo de 5,3 e mínimo de 0,7%). Geralmente, as fucanas extraídas de algas encontram-se contaminadas com proteínas. A variabilidade do teor protéico nas fucanas está relacionado ao método de extração e com a espécie de alga analisada. Hussein e col. (1980) encontraram em fucanas de *Padina pavonia* um elevado teor de proteínas (67%) enquanto que Dietrich e col. (1995) obtiveram para *Padina gymnospora* valores compreendidos entre 1,6-7,5%. Esses baixos valores indicaram a importância da proteólise durante a extração dos polissacarídeos das algas.

A heparina vem sendo utilizada como fármaco anticoagulante, desde a década de 30, e ainda continua sendo um dos principais fármacos utilizados em patologias trombogênicas. Contudo, esse polissacarídeo apresenta diversos efeitos adversos, o que faz com que seu uso não seja irrestrito (Nader et al, 2001).

Por esse motivo, a busca por substituintes da heparina vem crescendo, além da busca de compostos com distintos mecanismos de ação anticoagulante para atender a multiplicidade de situações clínicas que requerem esse tipo de terapia. Um dos principais grupos de compostos avaliados, nesse sentido, é o dos polissacarídeos sulfatados, devido às suas propriedades químicas estarem relacionadas com as da heparina (Sasahara & Loscalzo, 2003).

As frações obtidas das algas foram analisadas com relação à presença de atividade anticoagulante. De todas as frações analisadas, apenas as frações 1.0v e 1.5v de *D. menstrualis* apresentaram atividade anticoagulante mensurável. Várias fucanas têm se mostrado com atividades anticoagulante (Pereira et al., 1999; Nishino et al., 2000; Shanmugam et al., 2000). Tem sido observado que o mecanismo de ação predominante está correlacionado ao cofator II da heparina (Shanmugam et al., 2000).

Os estudos têm indicado que essas atividades das fucanas são diretamente dependentes de sua sulfatação (Haroun-Bohuheja et al., 2000). Pretende-se, em estudos posteriores, fazer a caracterização da ação anticoagulante das fucanas obti-

das da alga *D. menstrualis*, assim como promover modificações químicas nas fucanas para se determinar correlações entre estrutura e atividade anticoagulante.

CONCLUSÕES

Utilizando-se uma metodologia simples, foi possível extrair frações polissacarídicas ricas em fucanas de duas algas marrons. A presença das fucanas foi evidenciada por análises químicas e eletroforeses em agarose. O grau de contaminação protéica foi muito baixo indicando que a metodologia utilizada está apropriada para obtenção de fucanas de algas. As análises das atividades anticoagulantes das fucanas obtidas indicaram a presença de fucanas com potencial farmacológico que serão mais bem caracterizados em estudos posteriores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L. G. Polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha *Sargassum vulgare*. 2000. 86f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN, Natal, 2000.
- 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*, v.20, p.1237-1249, 1995.
- 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.*, v.115, p.155-161, 1936.
- CHEVOLOT, L.; MULLOY, B.; RATISKOL, J.; FOUCAULT, A.; COLIEC-JOUAULT S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydr. Res.*, v.330, p.529-535, 2001.
- CHIZHOV, A. O.; DELL, A.; MORRIS, H. R.; HASLAM, S.M.; MCDOWELL, R. A.; SHASHKOV, A. S.; NIFANT'EV, N. E.; KHATUNTSEVA, E. A.; USOV, A. I. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr. Res.*, v.320, p.108-119, 1999.
- DIETRICH, C. P.; FARIAS, G. G. M.; ABREU, L. R. D.; LEITE, E. L.; SILVA, L. F.; NADER H. B. A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. *Plant Sci.*, v.108, p.143-153, 1995.

- DODGSON, K. S. & PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, v.84, p.106-110, 1962.
- DUARTE, M. E. R.; CARDOSO, M. A.; NOSEDA, M. D.; CERESO, A. S. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr. Res.*, v.333, p.281-293, 2001.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. *Anal. Chem.*, v.28, p.350-356, 1956.
- 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*, v.85, p.479-491, 1997.
- FABRIS, F.; LUZZATTO, G.; STEFANI, P.M.; GIROLAMI, B.; CELLA, G.; GIROLAMI, A. Heparin-induced thrombocytopenia. *Haematologica*, v.85, p.72-81, 2000.
- HAROUN-BOUHEDJA, F.; MOSTAFA, E.; SINQUIN, C.; BOISSON-VIDAL, C. Relation between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thromb. Res.* v.100, p.453-459, 2000.
- HIRSH, J. New anticoagulants. *Am. Heart J.*, v.142, p.S3-8, 2001.
- MULLOY B.; MOURÃO P. A. S.; GRAY E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. *J. of Biotechnol.*, v.77, p.123-135, 2000.
- MELO, N F R & SOUZA F°, J F. Extração e caracterização de glicosidases envolvidas na degradação de glicosaminoglicanos sulfatados no *Crustacea Chaceon fenneri*. *Infarma, CFF*, Brasília, v.14, n 7/8, p.74-76, 2002.
- 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. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.34, p.699-709, 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.* v.39, p.793-816, 1979.
- ROCHA, H. A. O. Caracterização e uma fucana da alga *Spatoglossum schröederi* e análise de suas atividades anti-adesiva, antimigratória, antiproliferativa e antitrombotica. 2002. 205f. Tese (Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular) – Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP, São Paulo, 2002.
- SASAHARA A A & LOSCALS J (Ed) New therapeutic agents in thrombosis and thrombolysis. 2. Ed. New York: Macel Deker, Inc., 2003. 707p.
- SPECTOR, J. Refinement of the coomassie blue method of protein quantification. A simple and linear spectrophotometric assay of 0.5 to 50µg of protein. *Anal. Biochem.*, v.86, p.142-143,1978.
- WEITZ, J. New anticoagulant strategies. Current status and future potentials. *Drugs*, v.48, p.485-497, 1994.
- NISHINO, T.; YAMAUCHI, T.; HORIE, M.; NAGUNO, T.; SUZUKI H. Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA. *Thomb. Res.*, v. 99, p.623-634, 2000.
- HUSSEIN, M. M. D.; MAGDEL-DIN, B.; ABDEL-AZIZ, A.; SALEM, H. M. I. – Some structural features of a new sulphated heteropolysacchride from *Padina pavonia*. *Phytochemistry*, v.19, p.2133-2135, 1980.
- KYLIN, H. Biochemistry of sea algae. *Z. Physiol. Chem.*, v.83, p.171-197, 1913.
- PEREIRA, M. S.; MULLOY, B.; MOURÃO, P.A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. *J. Biol. Chem.*, v.274, p.7656-7667, 1999.
- SHANMUGAM, M. & MODY, K.H. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents, *Current Science*, v.79, p.1672-1683, 2000.