



Extração e caracterização físico-química dos polissacarídeos sulfatados da rodofíceia *Gracilaria cornea* J. Agardh e avaliação de seus efeitos sobre coagulação *in vitro*

Extraction and physical-chemical characterization of sulfated polysaccharides from the rhodophyceae *Gracilaria cornea* J. Agardh and evaluation of their effects on coagulation *in vitro*

José Ariévilto Gurgel Rodrigues*, Chistiane Oliveira Coura & Norma Maria Barros Benevides

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

*E-mail: arieviltoengpesca@yahoo.com.br

Recebido: 18 de junho de 2016 / Aceito: 20 de agosto de 2016 / Publicado: 13 de outubro de 2016

Resumo Estudos extensivos relacionados à caracterização físico-química e a análise dos efeitos sobre a coagulação frente à heparina (HEP) de polissacarídeos sulfatados (PSs) extraídos de macroalgas marinhas pertencentes ao gênero *Gracilaria* ainda são limitados. Este estudo avaliou os efeitos *in vitro* de PSs extraídos sequencialmente e caracterizados físico-quimicamente da alga marinha vermelha *G. cornea* sobre a coagulação. O tecido desidratado foi digerido sequencialmente (três vezes) com papaína em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo cisteína e EDTA (ambos 5 mM). Os dois primeiros extratos foram examinados quanto à composição e fracionados em coluna de troca-iônica (DEAE-celulose) aplicando concentrações diferentes de NaCl. As frações liofilizadas (F I; F II e F III eluídas com 0,5; 0,75 e 1,00 M de NaCl, respectivamente) foram analisadas quanto às características físico-químicas e efeitos sobre a coagulação usando os ensaios de eletroforese em gel de agarose e do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) utilizando plasma de coelho e HEP (193 UI mg⁻¹), respectivamente. O rendimento total foi 23,91 ± 0,36%, com a primeira extração (16,75 ± 0,98%) apresentando (p < 0,05) maior quantidade de PSs comparada a segunda e terceira extrações (7 ± 0,92 e 0,16 ± 0,73%, respectivamente). Esse perfil de rendimento confirmou o maior conteúdo de sulfato (18,50%) no extrato e metacromasia das frações obtidas da cromatografia da primeira extração quando comparada à segunda extração a qual revelou extrato menos sulfatado (15,66%), embora mostrando cromatograma semelhante entre extratos. A eletroforese revelou frações polidispersas e mobilidades similares aos extratos, porém distintas quanto ao grau de densidade de carga. O TTPA foi alterado modestamente em plasma tratado com a fração F II (1,47 UI mg⁻¹) da primeira extração. Os resultados permitem sugerir características físico-químicas diferentes dos PSs isolados de *G. cornea* que não contribuem para modificar acentuadamente a coagulação frente à HEP.

Palavras-chave: Rhodophyceae, extrações consecutivas, polímeros sulfatados, análises químicas, coagulação.

Abstract Extensive studies related to physical-chemical characterization and analyses of effects on the coagulation against heparin (HEP) of sulfated polysaccharides (SPs) extracted from marine macroalgae belonging to genus *Gracilaria* have been still limited. This study evaluated the *in vitro* effects of SPs sequentially extracted and physical-chemically characterized from the red seaweed *G. cornea* on coagulation. The dehydrated tissue was sequentially digested (three times) with papain in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing cystein and EDTA (both 5 mM). The two first extracts were examined on the composition and fractionated on ion-exchange column (DEAE-cellulose) applying different concentrations of NaCl. The lyophilized fractions (F I, F II and F III eluted with 0.5, 0.75 and 1.00 M NaCl, respectively) were analyzed on the physical-chemical characteristics and effects on coagulation using the assays of agarose gel electrophoresis and activated partial thromboplastin time (APTT) utilizing rabbit plasma and HEP (193 IU mg⁻¹), respectively. The total yield was 23.91 ± 0.36%, with first extraction (16.75 ± 0.98%) showing (p < 0.05) highest amount of SPs compared with second and third ones (7 ± 0.92 and 0.16 ± 0.73%, respectively). This profile of yield confirmed the higher sulfate content (18.50%) in extract and metachromasy of the fractions obtained from the chromatography of the first extraction when compared with second one which revealed lower sulfated extract (15.66%), although showing chromatogram similar between extracts. The electrophoresis revealed polydispersed fractions and mobilities similar as extracts, but distincts on the charge density pattern. The APTT was modestly altered in plasma treated with the fraction F II (1.47 UI mg⁻¹) from the first extraction. The results allow to suggest different physical-chemical characteristics of the SPs isolated from *G. cornea* where themselves do not contribute for accentually modifying the coagulation like HEP.

Keywords: Rhodophyceae, consecutive extractions, sulfated polymers, chemical analyses, coagulation.

Introdução

As macroalgas marinhas representam um grupo heterogêneo de organismos fotossintéticos de grande valor ecológico para o ecossistema marinho costeiro (Bolton, Oyieke & Gwada, 2007). Esses seres vivos estão agrupados em Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyta e expressam uma variedade de metabolitos químicos únicos estruturalmente (por exemplo, proteínas, carboidratos e lipídeos) (Cardozo et al., 2007; Hung et al., 2009; Rodrigues et al., 2012; Tabarsa, Ramezanpour & Waaland, 2012), os quais vêm atraindo o interesse de vários segmentos industriais ao longo de décadas no tocante às suas aplicações como espessantes, geleificantes e estabilizantes em preparações alimentícias (Campo, Kawano, Silva & Carvalho, 2009; Prajapati, Maheriya, Jani & Solanki, 2014) e outros benefícios relacionados à saúde humana e animal (Cardozo et al., 2007; Rodrigues, Júnior, Lourenço, Lima & Farias, 2009a; Vanderlei et al., 2011).

Algas marinhas vermelhas do gênero *Gracilaria* são mundialmente exploradas como fontes de polissacarídeos sulfatados (PSs) do tipo ágar (Mazumder et al., 2002; Marinho & Soriano, 2003; Maciel et al., 2008) apresentando funcionalidades intrínsecas como aditivos para alimentos e derivados (Cardozo et al., 2007) e efeitos biológicos para modular diversas reações fisiológicas (Araújo, Farias, Rodrigues, Torres & Pontes, 2008; Vanderlei et al., 2011; Fidelis et al., 2014). São macromoléculas complexas e heterogêneas de elevada massa molecular (frequentemente > 100 kDa) (Pomin, 2012; Fidelis et al., 2014), constituídas principalmente de galactose (ou derivados desse monossacarídeo), sendo formadas por unidades repetitivas de (1→3)-β-D-galactopiranosose (unidade A) e (1→4)-α-L-galactopiranosose (unidade B) (Mazumder et al., 2002; Maciel et al., 2008), as quais diferem das carragenanas, uma outra forma de PSs presentes em algas marinhas vermelhas, pela configuração estereoquímica da unidade B (Cardozo et al., 2007; Campo, Kawano, Silva & Carvalho, 2009; Prajapati, Maheriya, Jani & Solanki, 2014). Compõem a matriz extracelular desempenhando papéis quanto à mecânica e regulação iônica (Kloareg & Quatrano, 1988) e a abundância e ampla aplicabilidade dos PSs motivam a agregação de valor econômico para as espécies *Gracilaria* em vários países asiáticos, latino americanos e europeus (Cardozo et al., 2007) a partir da maricultura desses recursos aquáticos em áreas costeiras como perspectivas de produzir algas que produzam ficocolóides de valor comercial (Maciel et al., 2008; Hung et al., 2009; Rodrigues et al., 2011), ajudando também na recuperação de zonas eutrofizadas (Yang et al., 2006).

Desordens do sistema circulatório são originadas pelo estresse, hábitos alimentares inadequados e o sedentarismo pleno das pessoas, o que podem ocasionar a formação de trombos intravasculares impedindo o fluxo sanguíneo normal no corpo e, como consequência, gerando incapacidade total ou parcial ou até mesmo a morte do paciente (Nader et al., 2001). A heparina (HEP) é requerida primariamente como droga anticoagulante na prevenção e tratamento dos distúrbios tromboembólicos e sua ação é exercida devido à presença de sequência pentassacarídica específica ligante de antitrombina não encontrada em outras fontes ricas em PSs (Mourão, 2015), acelerando em cerca de 1000 vezes a inibição da trombina a qual é uma enzima que converte em coágulo de fibrina, podendo obstruir veias e artérias (Nader et al., 2001). Embora anticoagulante efetivo, a HEP induz hemorragia e trombocitopenia, especialmente quando em uso prolongado, além do risco de contaminação com partículas virais e outros PSs da família dos glicosaminoglicanos que podem potencializar os efeitos indesejáveis na mistura complexa contendo anticoagulantes (Melo, Pereira, Cunha, Sá & Mourão, 2008; Pomin, 2012; Mourão, 2015).

A ação anticoagulante é frequentemente encontrada em PSs de algas marinhas vermelhas, incluindo algumas espécies ocorrentes na linha costeira do Brasil. Por exemplo, Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias (2009b) relataram ação anticoagulante *in vitro* dos PSs isolados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia* superior a da HEP, usando plasma de coelho. A alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* possui PSs que praticamente não alteraram a coagulação humana normal *in vitro* frente à HEP (Rodrigues et al., 2011). Mais recentemente, Fidelis et al. (2014) demonstraram que PSs de massas moleculares elevadas exercem efeitos anticoagulantes maiores que os de baixo peso molecular. Revisões atestam que várias espécies de algas marinhas foram já descritas possuindo PSs com potenciais anticoagulantes *in vitro* e *in vivo*, motivando assim esforços crescentes na busca de alternativas à HEP (Pomin, 2012; Mourão, 2015).

A alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* J. Agardh é nativa do litoral brasileiro e possui como constituinte de parede celular um PS tipo ágar. A estrutura química desse ficocoloide é principalmente composta por 3,6-anidrogactose e galactose, com quantidades menores de 6-*O*-metil-galactose, glucose, xilose e grupos sulfatos (sulfatação no C-4 e C-6 da galactose). Estudos de viscosidade demonstraram que a molécula, em soluções aquosas, não demonstrou ser capaz de formar gel, possivelmente devido ao método papaína usado para obtenção dos PSs, o que postularia à obtenção de um ágar diferente daquele isolado em meio alcalino de exemplares coletados no México desta mesma espécie de alga (Melo, Feitosa, Freitas &

Paula, 2002). Subsequentemente, Coura et al. (2012, 2015) demonstraram efeitos analgésico e anti-inflamatório de PSs extraídos de *G. cornea* usando modelos convencionais de dor e inflamação aguda em roedores. Contudo, nenhuma avaliação extensiva quanto às características físico-químicas de PSs de matriz de parare celular e seus efeitos sobre a coagulação sanguínea foi demonstrada até o presente da referida espécie algácea.

Este estudo teve como finalidade extrair sequencialmente, caracterizar físico-quimicamente e avaliar os efeitos *in vitro* sobre a coagulação sanguínea de PSs presentes na matriz extracelular da macroalga bentônica marinha vermelha *G. cornea*.

Material e Métodos

ALGA MARINHA E ANÁLISES DOS PSs EXTRAÍDOS

Exemplares da alga *G. cornea* foram coletados do banco natural da praia de Flecheiras, município de Trairí, estado do Ceará, em agosto de 2008. No Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, a alga foi lavada com água destilada para eliminação de sal e areia, seguida da remoção de epífitas macroscópicas adensadas ao material. Após a limpeza, as amostras da alga foram armazenadas em freezer (- 20°C) até o uso.

Os PSs totais foram extraídos como descrito (Melo, Feitosa, Freitas & Paula, 2002), com algumas modificações (Coura et al., 2012 e 2015). Essencialmente cinco gramas de tecido desidratado e triturado foram digeridas com 17 mL de uma solução de papaína (30 mg mL⁻¹) (Vetec Química) em 250 mL de tampão acetato de sódio (AcNa) 100 mM (pH 5,0), contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM (QEEL) durante 6 h a 60°C em banho-maria (MARCONI, modelo MA 159). Logo após a digestão, o material foi filtrado em tela de náilon e centrifugado (2725 × g; 4°C; 30 min) e, ao sobrenadante, foram adicionados 48 mL de cloreto cetilpiridínio (CCP) a 10% (24 h; 25°C) para a precipitação dos PSs presentes na mistura. Logo após uma nova centrifugação, os PSs foram lavados (300 mL; CCP 0,05%), dissolvidos em 174 mL de NaCl 2 M: etanol comercial (100: 15; v:v) e novamente precipitados, por meio da adição de 300 mL de etanol comercial (24 h; 4°C). Em seguida, o material foi lavado com 300 mL de etanol de comercial a 80% (2 ×) e etanol de grau comercial (300 mL; 1 ×). Após o procedimento de diálise (membranas de celulose 43 × 27 mm) contra água destilada durante 24 h, os PSs foram liofilizados para posterior análise. Os resíduos de tecido da alga foram sujeitos à ré-extrações com papaína, com a finalidade de tornar ótimo o rendimento desses polianiônicos (n = 3) (Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b).

Os dados obtidos foram expressos como média ± e.p.m. e analisados por meio de Anova e, quando foi observada diferença entre os rendimentos das extrações, foi aplicado o teste de Tukey, considerando p < 0,05.

ANÁLISES QUÍMICAS

O conteúdo de carboidratos totais (CTs) dos PSs foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico de Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith (1956), utilizando a D-galactose para a obtenção da curva padrão. O conteúdo de proteínas contaminantes (PCs) foi estimado pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão. O conteúdo de sulfato (S) foi determinado pelo método gelatina-bário descrito por Dodgson & Price (1962), usando sulfato de sódio para a obtenção da curva padrão.

CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

Os PSs (30 mg) dissolvidos em tampão AcNa 0,05 M (1 mg mL⁻¹) foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna de Deae-celulose (22 × 0,65 cm) equilibrada e percolada com tampão AcNa 0,05 M até a completa remoção dos polissacarídeos não retidos, seguido do fracionamento dos PSs por eluição com o mesmo tampão de equilíbrio contendo NaCl em diferentes concentrações (0,50; 0,75 e 1,00 M) utilizando um coletor de frações (FRAC-920) com fluxo ajustado (60 mL h⁻¹). As frações (5,0 mL) foram monitoradas por meio de metacromasia usando o azul de 1,9-dimetilmetileno (Fandarle, Buttle & Barrett, 1986) em espectrofotômetro, ajustado a 525 nm. As frações metacromáticas assim obtidas foram dialisadas (membranas de celulose 43 × 27 mm) exaustivamente contra água destilada mediante a realização de cinco trocas diárias, durante três dias consecutivos, para eliminação do NaCl utilizado no fracionamento dos PSs. Em seguida, as referidas frações foram liofilizadas, para serem utilizadas nos ensaios posteriores.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Com a finalidade de caracterizar físico-quimicamente os PSs obtidos de *G. cornea*, quanto aos padrões e às densidades de cargas negativas, o procedimento de eletroforese em gel de agarose a 0,5%, utilizando o tampão 1,3 - acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0), foi realizado segundo Dietrich & Dietrich (1976).

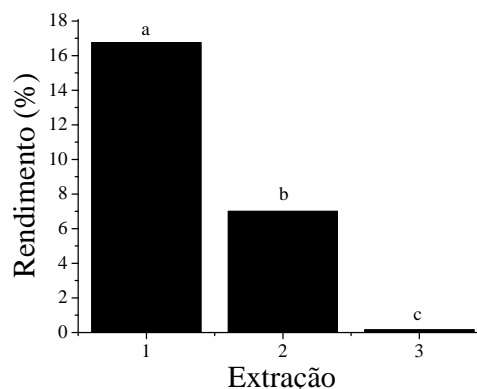
AVALIAÇÃO DO TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (TTPA)

Para a realização do ensaio *in vitro*, sangue de coelho citratado foi obtido de animais mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC. O teste do TTPA foi empregado para avaliar os efeitos dos PSs sobre a coagulação intrínseca segundo as especificações do fabricante. Os ensaios foram realizados em triplicata e o tempo de coagulação registrado automaticamente em um coagulômetro. A atividade anticoagulante foi expressa em termos de unidades internacionais (UI) por mg de polissacarídeo, utilizando uma curva padrão de HEP (193UI mg⁻¹; 4th International Heparin Standard, National Institute for Biological Standard and Control, Potters Bar, Herts, UK).

Resultados e Discussão

O resultado do emprego da metodologia que utiliza a digestão enzimática de proteínas por enzimas proteolíticas (papaína) na extração e o CCP na etapa de precipitação dos PSs está mostrado na figura 1. Foram realizadas três digestões sequenciais com papaína a partir do tecido desidratado de *G. cornea*. O maior rendimento foi obtido na primeira extração (16,75 ± 0,98%, $p < 0,05$) comparado a segunda e terceira extrações que apresentaram 7 ± 0,92 e 0,16 ± 0,73%, respectivamente, totalizando 23,91 ± 0,36% de PSs totais presentes na matriz da referida espécie de alga. Portanto, ficou demonstrado um decréscimo acentuado no rendimento, ao longo das três extrações de polissacarídeos totais similar ao perfil de rendimento de PSs encontrado para a rodofíceia *H. pseudofloresia*, da qual Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias (2009b) obtiveram rendimento de 47,14% usando incubação com papaína.

Figura 1. Rendimento dos PSs obtidos, por extrações sequenciais, da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas em nível de 5%.



PSs de algas marinhas podem ser extraídos por diferentes metodologias. Marinho-Soriano (2001) isolou, por meio da extração aquosa (1 h; pH 6,5; 60°C), os PSs das rodofíceas *Gracilaria gracilis* (30,00%), *G. dura* (33,50%) e *G. bursa-pastoris* (34,80%), enquanto Marinho & Soriano, 2003, avaliando a sazonalidade sobre o rendimento de PSs isolados em meio aquoso (1 h) das espécies *G. cervicornis* e *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta), obtiveram 11-20% e 29-41%, respectivamente. Maciel et al. (2008) constataram 6,50% de PSs da alga marinha vermelha *G. birdiae*, quando extraído em meio aquoso (25-28°C). Melo, Feitosa, Freitas & Paula (2002), utilizando-se da mesma metodologia do presente estudo, realizaram digestão (24 h; 60°C) única de *G. cornea* e obtiveram 21,40% de PSs após secos em estufa (24 h; 60°C). A diferença de rendimento de 1,28 vezes menor neste trabalho ao estudo de Melo, Feitosa, Freitas & Paula (2002) pode ser o resultado do emprego da diálise e liofilização para obtenção dos PSs de *G. cornea* (Rodrigues et al., 2012).

A maior quantidade de PSs obtidos na primeira extração determina a sugestão do modo de ação da papaína na remoção de moléculas da matriz como um resultado de desorganização da arquitetura de parede da alga onde se localizam os carboidratos complexados às proteínas (Kloareg & Quatrano, 1988). Esse fato possibilitaria à identificação de PSs diferentes ocorrentes na parede celular como possuidores de efeitos biológicos diferenciais sobre a coagulação dependentes das suas características físico-químicas (Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b).

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA (DEAE-CELULOSE)

Como os PSs obtidos na terceira extração apresentaram um rendimento muito baixo (0,16%) (Figura 1), os PSs obtidos na primeira e segunda extrações de *G. cornea* passaram a ser utilizados nos estudos subsequentes. A composição química (Tabela 1) mostrou que os PSs totais obtidos na primeira extração indicaram conteúdos de CTs e S maiores (68,80 e 18,50% respectivamente) ao serem comparados aos obtidos da segunda extração (81,26 e 15,70% para CTs e S, respectivamente). Esses valores de composição

química não foram em acordo com aqueles encontrados para outras espécies de algas do gênero *Gracilaria* que apresentaram CTs e S variando de 50,72-64,93% e de 4-10%, respectivamente (Mazumder et al., 2002; Maciel et al., 2008), porém foram coerentes aos obtidos de *G. cornea* segundo Coura et al. (2012). A ausência de PCs nas amostras dos polímeros analisados sugeriu a eficácia da digestão de proteínas da alga por meio do uso da papaína como esperado (Rodrigues et al., 2011; Coura et al., 2012).

Tabela 1. Composição química dos PSs totais (*Gracilaria cornea*) obtidos de ambas as extrações

Extração	PCs (%)	CTs (%)	S (%)
Primeira	-	68,80	18,50
Segunda	-	81,26	15,70

- Não detectado.

O elevado conteúdo de sulfato encontrado nos PSs totais obtidos na primeira e segunda extrações (Tabela 1) sugeriu a hipótese levantada no estudo Melo, Feitosa, Freitas & Paula (2002). Esses autores demonstraram que o emprego da papaína na obtenção dos PSs de *G. cornea* resulta, após a caracterização estrutural dos PSs por RMN, de uma diferença acentuada na proporção de galactose/3,6-anidrogactose que os valores de agarose ideal. A ausência de um comportamento geleificante dos PSs em soluções aquosas foi também correlacionada pelo elevado teor de sulfato obtido nas amostras, levando para uma diferença estrutural do polissacarídeo isolado da alga coletada no Brasil comparada à estrutura encontrada para os PSs isolados em meio alcalino de exemplares coletados no México. Segundo Mazumder et al. (2002), o tratamento alcalino é importante na indústria de alimentos, pois reduz significativamente o peso molecular desses polímeros, promovendo assim degradação da cadeia do polissacarídeo, bem como convertendo resíduos de L-galactose-6-sulfato em resíduos de 3,6-anidro- α -L-galactose.

O procedimento de cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-celulose, usando uma amostra de cada extrato total, está mostrado na figura 2.

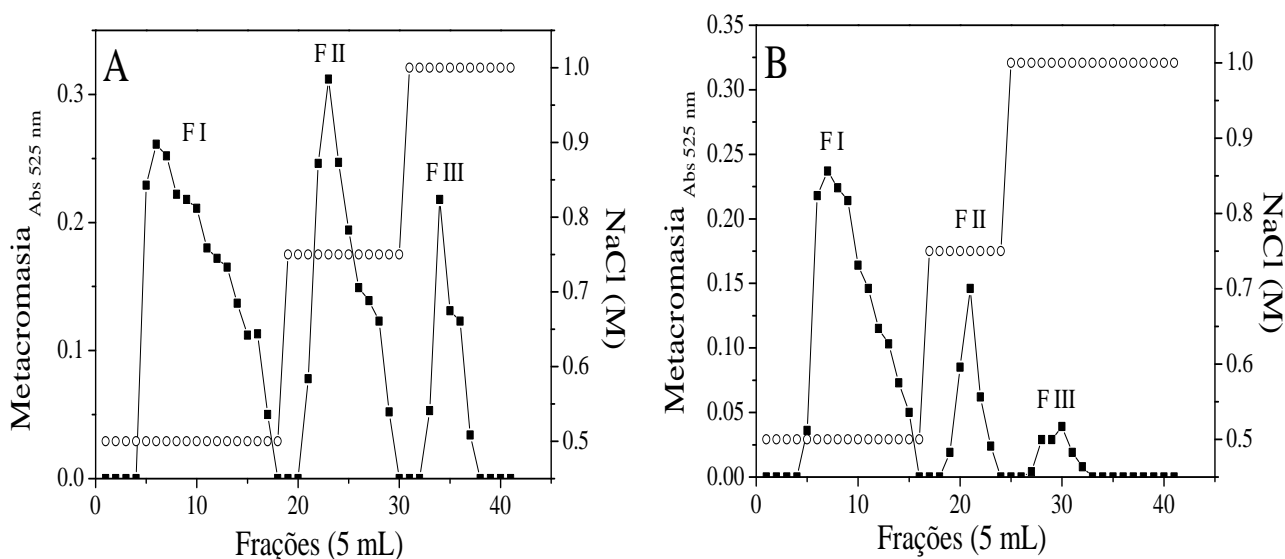


Figura 2. Cromatografia de troca-iônica em DEAE-celulose dos PSs (primeira (A) e segunda (B) extrações) da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0). Os PSs adsorvidos no gel foram eluídos com adição de NaCl (0,50; 0,75 e 1,00 M). (■—■) metacromasia; (○—○) concentração de NaCl (M).

Cromatogramas semelhantes entre a primeira e segunda extrações foram observados apresentando três frações polissacarídicas (F I; F II e F III) eluídas em 0,50; 0,75 e 1,00 de NaCl, respectivamente (Figura 2). PSs eluídos com 0,5 M de NaCl (F I) mostraram rendimentos maiores (54,66 e 30,33% para primeira e segunda extrações, respectivamente) (Tabela 2) que vieram a corroborar com as metacromasias verificadas dentre todas as frações obtidas da espécie, onde o aumento da molaridade de sal resultou na redução da propriedade metacromática e diminuição no rendimento das frações de PSs, especialmente na segunda extração (Figura 2B e Tabela 2). A diferença na metacromasia entre as duas extrações justificou o conteúdo

de sulfato listado na tabela 1 em que o corante azul de 1,9-dimetilmetileno reagiu com os grupos sulfatados presentes nas estruturas químicas das moléculas durante o monitoramento dos PSs (Figura 2) (Fandarle, Buttle & Barrett, 1986; Rodrigues et al., 2011; Rodrigues et al., 2016).

Tabela 2. Rendimento das frações de PSs obtidas por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*

Extração	Fração	NaCl (M)	Rendimento (%)
Primeira	F I	0,50	54,66
	F II	0,75	4,66
	F III	1,00	2,33
Segunda	F I	0,50	30,33
	F II	0,75	1,09
	F III	1,00	-

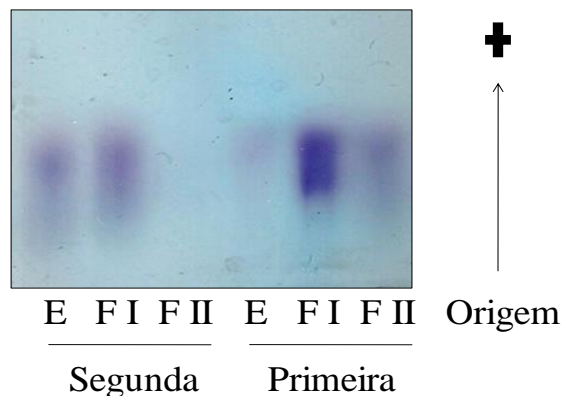
- Não reunida devido à escassez de material para análise.

Avaliando PSs extraídos da alga marinha vermelha *H. pseudofloresia*, Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias (2009b) constataram perfis cromatográficos (DEAE-celulose) diferentes, em termos de número de frações e intensidade metacromática, ao longo de três extrações sequenciais realizadas com papaína. As frações obtidas na terceira extração revelaram metacromasias majoritárias dentre todas as extrações da espécie, o que determinou a ocorrência de PSs mais diferenciados na sua matriz extracelular. Embora divergente este estudo apontou *G. cornea* como detentora de PSs possuindo composição distinta, com distribuição quase que equivalente na arquitetura de parede celular com base nos cromatogramas (Figura 2). Investigações relacionadas à sazonalidade e de ultraestrutura dessas moléculas poderão esclarecer melhor tal fato (Kloareg & Quatrano, 1988; Marinho & Soriano, 2003; Hung et al., 2009).

ELETROFORESE REVELA CARACTERÍSTICAS DISTINTAS ENTRE PSs DE MATRIZ

O procedimento de eletroforese em gel de agarose está ilustrado na figura 3 e a análise revelou PSs distintos quanto ao grau de densidade de carga entre extratos e frações.

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos PSs primeira e segunda extrações da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*. Extratos (E) e frações (F I e F II) presentes no gel foram corados com azul de toluidina a 0,1%.



Na primeira extração, o perfil eletroforético indicou frações polidispersas co-migrando com extrato sugerindo mesma conformação estrutural dos PSs (Dietrich & Dietrich (1976), apresentando fração F I com metacromasia preponderante em relação ao extrato e fração F II devido uma maior densidade de carga dos PSs (Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b) presentes na referida fração eluída da coluna de DEAE-celulose como esperado (Coura et al., 2015). Comportamento eletroforético semelhante foi também evidenciado na segunda extração, exceto fração F II a qual não foi visualizada no gel em virtude da metacromasia reduzida (Figuras 3 e 2B), o que também justificou a diferença de composição de sulfato entre as extrações de *G. cornea* (Tabela 2) (Rodrigues et al., 2011). Esses resultados combinados permitiram a especulação de que esses PSs poderiam ocorrer em diferentes proporções (Figuras 1 e 2) e quimicamente distintos (Tabela 1 e Figura 3) (Kloareg & Quatrano, 1988).

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS PSs DE *Gracilaria cornea* NA COAGULAÇÃO *in vitro*

Os efeitos das frações de PSs isolados de *G. cornea* sobre a coagulação foram avaliados por meio do teste clássico do TTPA usando plasma de coelho e HEP (193 UI mg⁻¹), como mostrado na tabela 3. Plasma

tratado com frações ($1,00 \text{ mg mL}^{-1}$) não inibiu a via da coagulação intrínseca como demonstrou o ensaio do TTPA com base no tempo controle ($16,23 \pm 0,17 \text{ s}$) sem PSs. Exceção a fração F II (primeira extração) que modificou discretamente o TTPA normal ($24,60 \pm 1,12 \text{ s}$; $1,47 \text{ UI mg}^{-1}$) (Rodrigues et al., 2011; Rodrigues et al., 2016), porém extendendo a coagulação *in vitro* em apenas 1,51 vezes ($T_1 T_0^{-1}$) e mostrando anticoagulação inferior a HEP, a qual ainda prolongou o TTPA intrínseco na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($32,10 \pm 0,81 \text{ s}$) (Nader et al., 2001).

Tabela 3. Avaliação dos efeitos das frações de PSs obtidas por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* comparadas a HEP.

Extração	Fração	NaCl (M)	Teste do TTPA *	
			$1,00 \text{ mg mL}^{-1} **$	$\text{UI mg}^{-1} ***$
Primeira	F I	0,50	$16,70 \pm 0,41 \text{ s}$	1,00
	F II	0,75	$24,60 \pm 1,12 \text{ s}$	1,47
Segunda	F I	0,50	$17,93 \pm 0,23 \text{ s}$	1,07

NaCl - Cloreto de Sódio; * Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA); ** Concentração de PSs para prolongar o TTPA em segundos; *** Atividade anticoagulante expressa em unidades internacionais (UI) por mg de PSs (UI mg^{-1}); HEP ($193,00 \text{ UI mg}^{-1}$; $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$; TTPA: $32,10 \pm 0,81 \text{ s}$); Controle: $16,23 \pm 0,17 \text{ s}$.

Vários PSs isolados de matriz extracelular de algas marinhas já foram descritos como anticoagulantes, resultando em efeitos diferenciais de frações sobre o TTPA (Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b; Pomin, 2012; Fidelis et al., 2014; Mourão, 2015). O polissacarídeo tipo ágar é formado por uma região não carregada (agarose) e outra carregada negativamente (agaropectina) (Cardozo et al., 2007). O baixo conteúdo de sulfato na sua estrutura química é também decorrente da presença de resíduos de açúcares contendo 3,6-anidrogactose originados pela conversão da sua forma precursora de resíduos de gactose-6-sulfato (Maciel et al., 2008). Essa característica peculiar de transformação química pode ser obtida por tratamento alcalino com a finalidade de aumentar a força do gel para aplicações alimentícias variadas na indústria (Campo, Kawano, Silva & Carvalho, 2009; Prajapati, Maheriya, Jani & Solanki, 2014). Por outro lado, polissacarídeos com conteúdos elevados de 3,6-anidrogactose podem não manifestar anticoagulação importante quando mensurados por ensaios de coagulação tradicionais (Rodrigues et al., 2016).

Este estudo está de acordo com outras espécies de *Gracilaria* detentoras de PSs que não apresentam impactos significativos na coagulação *in vitro*. Mazumder et al. (2002) verificaram que PSs extraídos em meio aquoso da alga marinha vermelha *Gracilaria corticata* se mostraram incapazes de modificar o tempo de trombina *in vitro*, mas exibiram ação antiviral seletiva contra o vírus herpes simples tipo I e tipo II, inibindo a adsorção viral e interferindo com a interação das glicoproteínas do vírus com os receptores de heparan sulfato presentes na membrana celular. Portanto, o uso de PSs de *G. cornea* em ensaios antivirais poderia inferir uma aplicação biotecnológica.

Rocha et al. (2005), avaliando uma galactofurana da alga marinha parda *Spatoglossum shroederi* em experimentos de coagulação, averiguaram que a molécula mostrou-se destituída de efeitos *in vitro*, mas expressou atividade antitrombótica *in vivo* de maneira tempo-dependente em ratos, cujo efeito foi relacionado com a síntese de heparan sulfato antitrombótico. Segundo revisões de Pomin (2012) e Mourão (2015), a ação dos PSs na coagulação sanguínea não ocorre meramente como uma função de densidade de cargas negativas. A composição monossacarídica, a posição de grupos sulfatados e principalmente a ocorrência de unidades dissulfatadas na estrutura química desses compostos são pré-requisitos importantes. A diversidade estrutural desses compostos entre diferentes espécies possibilita a descoberta de mecanismos peculiares, como também testando PSs em experimentos *in vivo*.

Diante das características físico-químicas (Figura 3) e os resultados obtidos sobre a coagulação *in vitro* através do teste do TTPA (Tabela 3) foi possível sugerir a ocorrência do mesmo tipo polissacarídeo na matriz de *G. cornea* (Rodrigues et al., 2016). Essa observação é importante, tendo em vista que se torna difícil desenvolver um produto natural em escala industrial devido à diversidade química e complexidade estrutural dos PSs de algas marinhas (Campo, Kawano, Silva & Carvalho, 2009; Prajapati, Maheriya, Jani & Solanki, 2014; Mourão, 2015). Adicionalmente, mostrou-se interessante relatar que os PSs de *G. cornea* não exercem anticoagulação para desempenhar ações anti-inflamatórias *in vivo* baseado em outros estudos, em que a concentração foi de pelo menos três vezes menor para produzir tais efeitos, sem apresentar manifestações de dano sistêmico importante de acordo com Coura et al. (2012 e 2015). Os efeitos

indesejáveis no uso de anti-inflamatórios não esteroidais, como úlceras e episódios de sangramento, tornam a busca de alternativas ainda uma necessidade atual (Vanderlei et al., 2011; Pomin, 2012).

Em suma, a alga marinha vermelha *G. cornea* possui PSs destituídos de ação anticoagulante por meio do teste do TTPA e a realização de ensaios de coagulação mais representativos no que tange uma possível ação sobre plaquetas e na inibição da geração de trombina poderão constituir novas vertentes para análises experimentais mais refinadas (Mourão, 2015). Uma avaliação mais detalhada dessas moléculas ao longo do ano seria também indicada (Rodrigues, Torres, Alencar, Sampaio & Farias, 2009b; Rodrigues et al., 2016).

Conclusão

A aplicação da técnica de extrações consecutivas por meio do uso de papaína é eficaz na otimização do rendimento de polissacarídeos sulfatados presentes na alga marinha vermelha *Gracilaria cornea*. Análise combinada dos procedimentos de cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) e eletroforese em gel de agarose revelam que o perfil bioquímico de polissacarídeos sulfatados é distinto na parede celular da espécie, embora apresentando distribuição quase que equivalente. As frações isoladas não apresentam efeitos anticoagulantes *in vitro* importantes quando mensuradas pelo ensaio do TTPA e que confirma a ineficácia desse sistema de moléculas para modificar a coagulação intrínseca, quando derivadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Gracilaria*.

Referências

- Araújo, G.S.A., Farias, W.R.L., Rodrigues, J.A.G., Torres, V.M. & Pontes, G.C. (2008). Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia. *Revista Ciências Agronômicas*, 39(4), 548-554.
- Bolton, J.J., Oyieke, H.A. & Gwada, P. (2007). The seaweed of Kenya: checklist, history of seaweed study, coastal environment, and analysis of seaweed diversity and biogeography. *South African Journal of Botany*, 73(1): 76-88.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Campo, V.L., Kawano, D.F., Silva, D.B. & Carvalho, I. (2009). Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - a review. *Carbohydrate Polymers*, 77(2): 167-180.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O. & Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. Part C - Toxicology and Pharmacology*, 146(102): 60-78.
- Coura, C.O., Araújo, I.W.F., Vanderlei, E.S.O., Rodrigues, J.A.G., Quinderé, A.L., Fontes, B.P., Queiroz, I.N.L., Menezes, D.B., Bezerra, M.M., Silva, A.A.R., Chaves, H.V., Jorge, R.J.B., Evangelista, J.S.A.M. & Benevides, N.M.B. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 110(4): 335-341.
- Coura, C.O., Souza, R.B., Rodrigues, J.A.G., Vanderlei, E.S.O., Araújo, I.W.F., Ribeiro, N.A., Frota, A.F., Ribeiro, K. A., Chaves, H. V., Pereira, K. M. A., Cunha, R. M. S., Bezerra, M. M. & Benevides, N. M. B. (2015). Mechanisms involved in the anti-inflammatory action of a polysulfated fraction from *Gracilaria cornea* in rats. *Plos One*, 10(3): e0119319.
- Dietrich, C.P. & Dietrich, S.M.C. (1976). Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Analytical Biochemistry*, 70(2): 645-647.
- Dodgson, K.S. & Price, R.G. (1962). A note on the determination of the ester sulfato content of sulfated polysaccharides. *Biochemical Journal*, 84(1): 106-110.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3): 350-356.
- Farndale, R.W., Buttle, D.J. & BARRETT, A.J. (1986). Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 883(2): 173-177.
- Fidelis, G.P., Camara, R.B.G., Queiroz, M.F., Costa, M.S.S.P., Santos, P.C., Rocha, H.A.O. & Costa, L.S. (2014). Proteolysis, NaOH and ultrasound-enhanced extraction of anticoagulant and antioxidant sulfated polysaccharides from the edible seaweed, *Gracilaria birdiae*. *Molecular*, 19(11): 18511-18526.
- Hung, L.D., Hori, K., Nang, H.Q., Kha, T. & Hoa, L.T. (2009). Seasonal changes in growth rate,

- carrageenan yield and lectin content in the red alga *Kappaphycus alvarezii* cultivated in Camranh Bay, Vietnam. *Journal Applied Phycology*, 21(3): 265-272.
- Kloareg, B. & Quatrano, R.S. (1988). Structure of the cell wall of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 26(1): 259-315.
- Maciel, J.S., Chaves, L.S., Souza, B.W.S., Teixeira, D.I.A., Freitas, A.L.P., Feitosa, J.P.A. & Paula, R.C.M. (2008). Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Carbohydrate Polymers*, 71(4): 55-565.
- Marinho-Soriano, E. & Bourret, E. (2003). Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresoprce Technology*, 90(3): 329-333.
- Marinho-Soriano, E. (2001). Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). *Journal Biotechnology*, 89(1): 81-84.
- Mazumder, S., Ghosal, P.K., Pujol, C.A., Carlucci, M.J., Damonte, E. & Ray, B. (2002). Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *International Journal of Biological Macromolecules*, 31(1-3), 87-95.
- Melo, M.R.S., Feitosa, J.P.A., Freitas, A.L.P. & Paula, R.C.M. (2002). Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers*, 49(4): 491-498.
- Melo, E.I., Pereira, M.S., Cunha, R.S., Sá, M.P.L. & Mourão, P.A.S. (2008). Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 23(2): 169-174.
- Mourão, P.A.S. (2015). Perspective on the use of sulfated polysaccharides from marine organisms as a source of new antithrombotic drugs. *Mar. Drugs*, 1(5): 2770-2784.
- Nader, H.B., Pinhal, M.A.S., Baú, E.C., Castro, R.A.B., Medeiros, G.F., Chavante, S.F., Dietrich, C.P. (2001). Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interactions with vascular endothelial cells. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, 34(6): 699-709.
- Prajapati, V.D., Maheriya, P.M., Jani, G.K. & Solanki, H.K. (2014). Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*, 105(25): 97-112.
- Pomin, V.H. (2012). Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(12): 1971-1979.
- Rocha, H.A.O., Moraes, F.A., Trhindade, E.S., Franco, C.R.C., Torquato, R.J.S., Veiga, S.S., Valente, A.P., Mourão, P.A.S., Leite, E.L., Nader, H.B. & Dietrich, C.P. (2005). Structural and haemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schoederi*. An ideal antithrombotic agent? *Journal Biological Chememistry*, 280(50): 41278-41288.
- Rodrigues, J.A.G., Júnior, J.S., Lourenço, J.A., Lima, P.C.W.C. & Farias, W.R.L. (2009a). Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Halymenia pseudofloresia* mediante uma estratégia profilática. *Revista Ciência Agronômica*, 40(1): 71-78.
- Rodrigues, J.A.G., Torres, V.M., Alencar, D.B., Sampaio, A.H. & Farias, W.R.L. (2009b). Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. *Revista Ciência Agronômica*, 40(2): 224-231.
- Rodrigues, J.A.G., Araújo, I.W.F., Paula, G.A., Lima, T.B., Bessa, E.F. & Benevides, N.M.B. (2011). Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em Flecheiras, Estado do Ceará, Brasil. *Acta Scientiarum Technology*, 33(2): 137-144.
- Rodrigues, J.A.G., Vanderlei, E.S. O., Quinderé, A.L.G., Queiroz, I.N.L., Bessa, E.F. & Benevides, N.M.B. (2012). Analysis of two drying methods on the yield and activity of sulfated polysaccharides extracted from *Halymenia* sp. (Rhodophyceae). *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 34(1): 5-11.
- Rodrigues, J.A.G., Queiroz, I.N.L., Quinderé, A.L.G., Benevides, N.M.B., Tovar, A.M.F. & Mourão, P.A.S. (2016). Extraction and structural properties of *Acanthophora muscoides* (Rhodophyceae) extracellular matrix sulfated polysaccharides and their effects on coagulation. *Acta Scientiarum Technology*, 38(3): 273-282.
- Tabarsa, M., Ramezanpour, Z. & Waaland, J.R. (2012). Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(12): 2500-2506.
- Vanderlei, E.S.O., Araújo, I.W.F., Quinderé, A.L.G., Fontes, B.P., Eloy, Y.R.G., Rodrigues, J.A.G., Silva, A.A.R., Chaves, H.V., Jorge, R.J.B., Menezes, D.B., Evangelista, J.S.A.M., Bezerra, M.M. & Benevides, N.M.B. (2011). The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated

polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Inflammation Research*, 6(12): 1121-1130.

Yang, Y.F., Fei, X.G., Song, J.M., Hu, H.Y., Wang, G.C. & Chang, I.K. (2006). Growth of *Gracilaria lemaneiformes* under different cultivation conditions and its effects on nutrient removal in Chinese coastal waters. *Aquaculture*, 254(1-4): 248-255.