



HOLOS

ISSN: 1518-1634

holos@ifrn.edu.br

Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia do Rio Grande do Norte  
Brasil

Melo, K.R. T.; Almeida - Lima, J.; Gomes, D.L.; Dantas - Santos, N.; Camara, R.G.B.;  
Rocha, H.A.O.

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS  
SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA MARROM *Dictyopteria justii*

HOLOS, vol. 1, 2012, pp. 29-40

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte  
Natal, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=481549264003>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

**CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA MARROM *Dictyopteris justii***K.R.T. Melo<sup>1</sup>, J. Almeida-Lima<sup>1</sup>, D.L. Gomes<sup>1</sup>, N. Dantas-Santos<sup>1</sup>, R.G.B. Camara<sup>1</sup>, H.A.O. Rocha<sup>1</sup><sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
melo.krt@gmail.com - biolottus23@yahoo.com.br - dayanegomes@hotmail.com - nednaldod@hotmail.com -  
rafael\_bgc@yahoo.com.br - hugo@cb.ufrn.br

Artigo submetido em novembro/2011 e aceito em março/2012

**RESUMO**

O aumento da incidência de doenças cardiovasculares e os efeitos adversos do seu medicamento anticoagulante principal (Heparina) estimulam a busca de novos compostos anticoagulantes. No presente estudo, cinco frações ricas em polissacarídeos sulfatadas denominadas de F0,3v; F0,4v; F0,5v; F1,2v, e F1,9v foram obtidas a partir da alga *Dictyopteris justii* através da digestão proteolítica, seguido de fracionamento com acetona. A presença de polissacarídeos sulfatados foi

confirmada por análise eletroforética. Além disso, esta análise mostrou também que *D. justii* sintetiza três tipos de polissacarídeos sulfatados (duas heterofucanas e uma glucana), que são distribuídos ao longo das frações. Um resultado importante foi a atividade aPTT da fração F0,4v, que foi semelhante ao da Heparina. F0,4v, é composta principalmente de uma heterofucana chamada de população A. Esta é, portanto, um agente promissor para a sua possível utilização em terapia anticoagulante.

**PALAVRAS-CHAVE:** Alga parda, Fucana, Glucana sulfatada, Polissacarídeos bioativos**CHARACTERIZATION AND ANTICOAGULANT ACTIVITY OF SULFATED POLYSACCHARIDES EXTRACTED FROM BROWN SEAWEED *Dictyopteris justii*****ABSTRACT**

The increased incidence of cardiovascular disease and the adverse effects of the main anticoagulant medicine (heparin) stimulate the search for novel anticoagulants compounds. In the present study, five sulfated polysaccharides-rich fractions, denominated F0,3v; F0,4v; F0,5v; F1,2v; and F1,9v were obtained from seaweed *Dictyopteris justii* through proteolytic digestion, followed by acetone fractionation. The presence of sulfated polysaccharides was confirmed by electrophoretic analyses. In addition, these analyses also showed that *D. justii* synthesizes three kinds of sulfated polysaccharides (two heterofucans and one glucan) which are distributed over the fractions. A

significant result was the aPTT activity of the fraction F0,4v, which was similar to that of heparin. F0,4v is composed mainly a heterofucan named pool A. This fucan is therefore promising agent for their possible use in anticoagulant therapy.

**KEY-WORDS:** Brown algae, Fucan, Sulfated glucan, Bioactive polysaccharides

## CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA MARROM *Dictyopterus justii*

### INTRODUÇÃO

Os transtornos cardiovasculares são considerados as maiores causas de morte na atualidade. Mais de 17 milhões de pessoas perderam suas vidas vitimadas por causas relacionadas direta ou indiretamente com estes transtornos em 2008, e cerca de 3 milhões dessas mortes ocorreram com pessoas com menos de 60 anos de idade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Vários estudos apontam que fatores como a urbanização, o envelhecimento, e as mudanças de estilo de vida global, as quais incluem sedentarismo, obesidade e tabagismo contribuíram para essa estatística.

O principal caminho patológico responsável por levar a esses transtornos cardiovasculares é a aterosclerose. Essa corresponde a um processo complexo, lento e silencioso, o qual se caracteriza pela formação de placas conhecidas como ateromas no revestimento interno das artérias (LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011). A formação do ateroma faz com que a superfície interna das artérias torne-se irregular e o seu lúmen cada vez mais estreito, dificultando a fluência do sangue nesses vasos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Quando acontece a ruptura do ateroma, ocorre à exposição de moléculas pró-coagulantes no vaso, que, ao se associarem a fatores de coagulação, promovem a formação de trombos, capazes de interromper o fluxo sanguíneo “*in situ*” ou se deslocar, alojando-se nas artérias distais, e impedindo o fluxo nesses locais (LIBBY, RIDKER e HANSSON, 2011).

Uma das principais maneiras de se combater a formação de trombos sanguíneos em pacientes é a administração de fármacos anticoagulantes. A heparina, devido ao seu amplo espectro de ação, a mais utilizada na terapêutica, que faz com que seu consumo mundial gire em torno de toneladas (WEITZ e WEITZ, 2010). Apesar dos benefícios, esse fármaco pode apresentar diversas reações indesejáveis, sendo o risco de sangramento e a trombocitopenia tipo II as mais graves (BEYER et al, 2010). Outros efeitos como osteopenia e efeito hemorrágico residual também já foram observados (NADER et al, 2004). Além disso, a heparina, por ser de origem animal, apresenta sempre o potencial de se contaminar por partículas virais ou outros agentes (ROCHA et al, 2004). Por exemplo, recentemente, lotes de heparina chinesa contaminada com condroitim (polissacarídeo) supersulfatado chegaram ao mercado americano e em período de aproximadamente cinco meses foram responsáveis por 238 óbitos de pacientes (BEYER et al, 2010).

Diante do exposto, vários grupos de pesquisadores vêm investigando moléculas com potencial anticoagulante que possam vir a substituir a heparina em todas ou algumas indicações clínicas. Como a heparina é um Polissacarídeo Sulfatado (PS), a busca de outros polissacarídeos sulfatados que tivessem atividade anticoagulante foi algo natural (NADER et al, 2004). Os PS compreendem um grupo complexo de polímeros aniônicos com um vasto leque de importantes propriedades biológicas. As algas marinhas são a fonte mais importante dessas macromoléculas (COSTA et al, 2010). Homo e heterogalactanas são exemplos de polissacarídeos sulfatados anticoagulantes encontrados em algas porém, são as fucanas aqueles mais bem estudados (LI et al, 2008).

Fucana é um termo usado para definir um grupo de polissacarídeos sulfatados que apresentam na sua constituição  $\alpha$ -L-fucose sulfatada. Tais macromoléculas podem ser encontradas na forma de homopolímeros (homofucanas) e de heteropolímeros (heterofucanas ou fucoidan) (LI et al, 2008, VIDAL, et al, 2010) e só são sintetizadas por algas pardas e equinodermas (ROCHA et al, 2005a). As fucanas vêm sendo largamente descritas na literatura por serem possuidoras de diversas atividades farmacológicas, como antitrombóticas (ALMEIDA-LIMA et al, 2010), antivirais, antitumoral, antioxidante (LI et al., 2008) e antiadesiva (ROCHA et al, 2001). Notoriamente, a atividade anticoagulante é a mais amplamente estudada (ROCHA et al., 2005a; BARROSO et al., 2008).

Os estudos do mecanismo de ação anticoagulante das fucanas também estão em fase avançada de conhecimento. Por exemplo, já se demonstrou que o fucoidan extraído da alga *Ecklonia kurome* é capaz de inibir a geração de trombina bloqueando a formação do complexo protrombinase, prevenindo a geração do fator Xa e aprimorando a atividade da antitrombina via cofator II da heparina (Li et al. 2008). Além desses, as fucanas também podem atuar de forma indireta no processo de coagulação, promovendo a liberação do TFPI (inibidor do fator tecidual) ou de heparan sulfato (glicosaminoglicano) por células endoteliais (ALMEIDA-LIMA et al., 2010; ROCHA et al., 2005b; NADER et al., 2004).

Estudos estruturais evidenciaram que cada fucana apresenta características estruturais que lhes são únicas devido a fatores como tipo de ligações glicosídicas, presença ou não de ramificações, posições de sulfato e composição monossacarídica (HOLTKAMP, et al., 2009). Assim cada nova fucana obtida traz sempre consigo perspectivas de descoberta de um novo fármaco ou de um composto promissor (COSTA et al., 2010).

São encontradas várias espécies de algas marrons no litoral do Nordeste brasileiro, porém poucas tiveram suas fucanas avaliadas. Recentemente, Magalhães e colaboradores (2011) mostraram que fucanas da alga *Dictyopteris delicatula* apresentavam atividade anticoagulante. Entretanto, outra alga deste mesmo gênero, também encontrada no litoral nordestino, ainda não teve suas fucanas analisadas como anticoagulantes, a alga *Dictyopteris justii*. Assim, objetivou-se neste trabalho extrair fucanas da alga *D. justii* e avaliar o potencial anticoagulante destas fucanas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Extração de polissacarídeos

A alga *Dictyopteris justii* (J.V.Lamouroux) foi coletada na praia de Maracajaú, município de Maxaranguape (RN, Brasil). A extração de polissacarídeos sulfatados foi adaptada da metodologia descrita por Rocha et al. (2005a). A alga após a coleta foi limpa com água corrente e seca em estufa aerada a 45° C. Posteriormente foi triturada e submetida a um processo de despigmentação e delipidação. Após nova secagem sob temperatura ambiente, foram adicionados dois volumes de NaCl 0,25 M à massa resultante, e o pH foi ajustado para 8,0 com NaOH e adicionou-se Proxima (proteaze alcalina) a mistura para digestão proteolítica. Após 18 h de incubação a 60° C, a mistura foi filtrada e centrifugada (10.000 x g, 10 min., 4° C) e o sobrenadante foi fracionado por precipitação com acetona. Assim, inicialmente, 0,3

volumes de acetona (4 °C) foram adicionadas à solução sob agitação suave e mantida a 4° C por 12 h. A seguir, o precipitado foi separado da solução por centrifugação (10.000 x g, 10 min., 4° C), secado e armazenado para as análises posteriores. Ao sobrenadante obtido nessa etapa, adicionou-se mais solvente até se obter a turvação do material. Esse procedimento foi repetido com volumes crescentes de acetona até não se conseguir mais a turvação do sobrenadante.

### **Eletroforese em gel de agarose**

Para visualizar a presença de polissacarídeos sulfatados nas frações obtidas, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na presença de tampão 1,3 - diaminopropano acetato (PDA) como descrito previamente (ROCHA et al, 2005a). Posteriormente o gel foi desidratado e corado com azul de toluidina.

### **Caracterização Química e Composição Monossacarídica**

Os açúcares totais foram estimados pela reação de fenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> usando L-fucose como padrão conforme descrito por Dubois et al, 1956. As fucans foram hidrolizadas (4 M HCl, 100 ° C, 6 h) e o teor de sulfato foi determinado de acordo com o método de bário-gelatina (DODGSON e PRICE, 1962), usando uma curva padrão de sulfato de sódio (1 µg / µL). O Teor de proteína, por sua vez, foi medido usando o método modificado de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão (1 µg / µL).

A composição monossacarídica foi determinada como descrito em Rocha e colaboradores (2005a). Utilizou-se como padrão os açúcares: glucose, xilose, galactose, ácido glucurônico, rhamnose, fucose e arabinose

### **Atividade Anticoagulante *in vitro***

Para a análise da atividade anticoagulante das fucanas, dois ensaios foram realizados: tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e tempo de protrombina (PT). Tais ensaios foram feitos utilizando-se kits comerciais e as condições experimentais foram aquelas recomendadas pelo fabricante (Labtest, São Paulo, SP, Brasil). Os tempos de coagulação foram determinados utilizando-se um coagulômetro como descrito anteriormente por Albuquerque e colaboradores (2004). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram comparados com os valores obtidos pela Clexane® (heparina de baixo peso molecular).

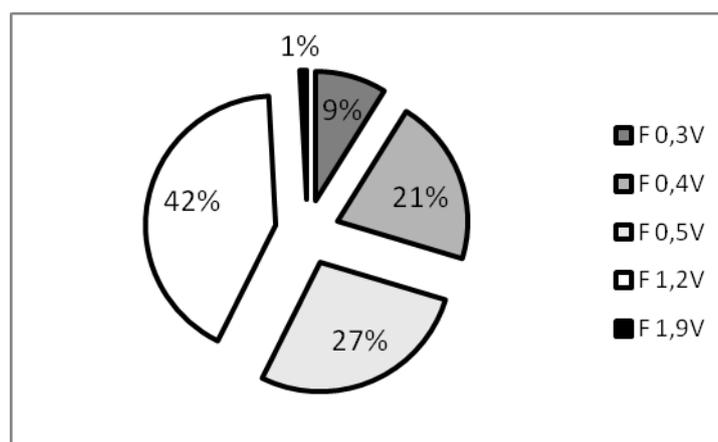
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Caracterização Química**

Para se verificar a presença de polissacarídeos sulfatados na *Dictyopteris justii*, essa alga passou por um tratamento inicial como descrito em materiais e métodos, e, após a proteólise, obtiveram-se extratos ricos em polissacarídeos que foram submetidos à precipitação com o acréscimo de vários volumes de acetona. Desse modo, obtiveram-se cinco frações que foram denominadas de F 0,3v, F 0,4v, F 0,5v, F 1,2v, e F 1,9v.

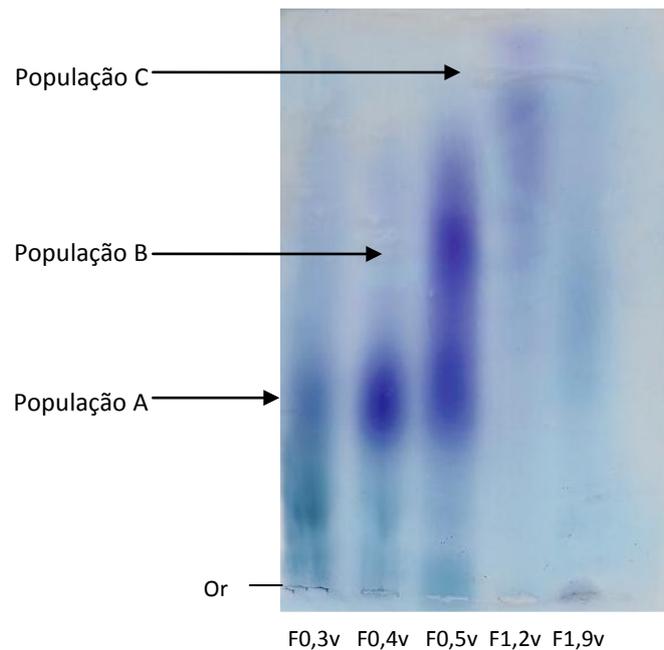
A adição de volumes crescentes de acetona diminui gradualmente a constante dielétrica da água, promovendo as diferentes taxas de precipitação dos polissacarídeos sulfatados. Desse modo, a acetona separa tais polissacarídeos por sua forma de interação com a água. Assim, aqueles que interagem mais com a água são os últimos a se precipitarem (MAGALHÃES et al, 2011).

Mediante esses procedimentos iniciais, o material obtido foi seco e pesado. A partir de 55 g de alga seca e não delipidada foi obtido 14,16 g de massa total correspondente a soma de todas as frações polissacarídicas. Assim, foi possível calcular o rendimento de cada uma delas. Dessa maneira, verificou-se que a última fração (F1,9v) teve o menor rendimento percentual, de 1%. Já as frações F0,3v, F0,4v e F0,5v tiveram rendimento de 9%, 21% e 27% respectivamente, e o melhor rendimento foi apresentado pela fração F1,2v, correspondendo a 42% do total da massa precipitada (FIGURA 1)



**FIGURA 1: Rendimento percentual das frações da alga *Dictyopterus justii* obtidas por meio de precipitação com acetona**

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. Na figura 2, observa-se a lâmina obtida com esse procedimento.



**FIGURA 02 – Comportamento eletroforético das frações resultantes do fracionamento da alga *D. justii* com volumes crescentes de acetona. Massas diferentes de cada fração (350 µg da fração F1,9v, 200µg das frações F0,3v, F0,5v, F 1,2v, e 50µg da fração F0,4v) foram aplicados no gel de agarose em tampão PDA (1,3-diaminopropano-acetato) pH 9.0 e submetidas a eletroforese à 100V/cm por 1 hora. O gel foi mantido em 0.1% CTV (cetiltrimetilamônio), desidratado e os polissacarídeos foram corados com azul de toluidina 0.1% em uma solução contendo 49% de etanol e 1% de ácido acético em água. (Or – origem da corrida).**

Pode-se evidenciar, pelo padrão violáceo de bandeamento, a presença de polissacarídeos sulfatados nas frações. A fração F0,3v apresenta seus componentes próximos da origem, destacando-se uma banda com pouca mobilidade eletroforética, que foi denominada de população A. Esta banda também é observada em F0,4v, porém, nesta fração, ela se apresenta em maior quantidade. A fração F0,5v apresenta também a população A, todavia uma segunda banda, de maior migração eletroforética, denominada de população B, foi detectada. Identificou-se ainda uma terceira população, contudo, esta só foi detectada na fração F1,2v. A fração F1,9v apresenta seus componentes bem disperso pelo gel e mesmo com concentração maior do que as demais frações não foi possível se identificar nela uma população predominante.

No sistema de eletroforese utilizado a diamina, presente no tampão, interage com os grupamentos sulfatos presentes nos polissacarídeos sulfatados, bloqueando suas cargas, e apenas aqueles grupos sulfatos que não interagiram com a diamina é que fazem o polissacarídeo migrar de um pólo em direção ao outro. Esses sulfatos não interagem com a diamina devido a impedimentos estruturais provenientes da conformação que o polissacarídeo assume (DIETRICH e DIETRICH, 1976). Portanto, polissacarídeos sulfatados que possuem estruturas semelhantes têm mobilidade semelhante. Assim pode-se inferir que a alga *D. justii* sintetiza três populações principais de polissacarídeos sulfatados. Outras algas que produzem três diferentes populações de polissacarídeos sulfatados já foram descritas,

por exemplo, as algas *Spatoglossum schroederi* (ROCHA et al, 2005a; ALMEIDA-LIMA et al, 2011) e *Dictiopteris delicatula* (MAGALHÃES et al, 2011).

Com relação à caracterização química das frações polissacarídicas (Tabela 1), foi observado um alto teor de açúcares totais em todas as frações, com exceção da F1,9v, cujo teor correspondente é 39,3%. Já as frações F1,2v, F0,3v, e F0,4v apresentaram valores correspondentes a 76,36%, 67,48%, 59,60% respectivamente. A fração com a maior taxa percentual foi a F0,5v, correspondente a 77,22% de açúcares. Estes valores podem ser considerados altos se comparados com os valores obtidos com frações de algas como *Spatoglossum schroederi* (Rocha et al. 2005a) e *Canistrocarpus cervicornis* (Camara et al., 2011) que não foram superiores a 50 % e mostra que o teor de açúcar varia de acordo com a espécie de alga estudada.

Já o teor de sulfato das frações apresentou uma variação de 3,9% a 12,07%, sendo o maior valor percentual, o da fração F1,9v. Esse fato foi surpreendente, uma vez que no sistema de eletroforese, quase não se identificou a presença de polissacarídeos sulfatados nessa fração. A coloração dos compostos sulfatados pelo azul de toluidina depende da conformação que o polissacarídeo assume após a corrida eletroforética. Assim, compostos muito sulfatados podem não se corar tão intensamente, se a conformação que ele assumir não permitir a interação do azul de toluidina com os grupos sulfato. Esse fato junto com a polidispersão dos componentes de F1,9v explicariam a não observação de bandas intensamente coradas com azul toluidina nesta fração, apesar dela possuir valores elevados de sulfato. Efeito semelhante foi observado por Costa (2010), que trabalhando com PS da alga *Caulerpa cupressoides* verificou que o polissacarídeo mais sulfatado não se corava com azul de toluidina após corrida eletroforética.

Quando se compara os valores de teor de sulfato verificados em frações polissacarídicas da *D. justii* com aqueles descritos para frações de outra alga, desse mesmo gênero, encontrada no litoral do Rio Grande do Norte, *D. delicatula*, percebe-se que os valores descritos nesse trabalho são mais baixos, pois essa alga apresentou teores que variam de 14 a 19% (MAGALHÃES et al. 2011). No entanto, outros estudos recentes realizados por Câmara et al. (2011) utilizando a alga marrom *Canistrocarpus cervicornis* mostraram frações polissacarídicas com teores de sulfato variando de 2,8 a 20,1%, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Com isso, pode-se notar que a quantidade de sulfato e teor de açúcares totais das algas pode variar independente das características do mesmo gênero.

A contaminação protéica foi baixa nas frações F0,3v, F0,4v, F0,5v e não detectada para F1,2v e F1,9v (Tabela 1). Tal resultado pode ser considerado baixo se comparado com outros autores como Hussein et al. (1980) que encontraram em fucanas de *Padina pavonia* um elevado teor de proteínas (67%). Já Dietrich et al. (1995) obtiveram para *Padina gymnospora* valores compreendidos entre 1,6 - 7,5%. Mas recentemente, Silva et al., 2005, utilizando a mesma metodologia de extração usada neste trabalho, obtiveram frações com níveis de contaminação variando entre 0,6 e 5,8% (SILVA et al., 2005). Esses dados indicam que o uso de proteases como passo inicial durante o processo de extração dos polissacarídeos é essencial para a obtenção de baixos níveis de contaminantes protéicos. Contudo, o teor desse componente também sofre variação com relação à espécie de alga e à sazonalidade.

**Tabela 1: Caracterização química dos polissacarídeos sulfatados**

Frações	Açúcar Total (%)	Sulfato (%)	Proteínas (%)	Relações Percentuais dos Monossacarídeos (%)			
				Glu	Xil	Ac. Glu	Fuc
F0,3v	<b>67,48</b>	<b>3,90</b>	<b>1,63</b>	<b>31,6</b>	<b>21,3</b>	<b>37,3</b>	<b>9,8</b>
F0,4v	<b>59,60</b>	<b>7,50</b>	<b>0,96</b>	<b>20,6</b>	<b>28,4</b>	<b>29,3</b>	<b>21,8</b>
F0,5v	<b>77,22</b>	<b>4,32</b>	<b>0,14</b>	<b>83,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>17,0</b>
F1,2v	<b>76,36</b>	<b>6,77</b>	<b>Nd</b>	<b>95,2</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>4,8</b>
F1,9v	<b>39,30</b>	<b>12,07</b>	<b>Nd</b>	<b>49,1</b>	<b>38,7</b>	<b>0,0</b>	<b>12,2</b>

**N.d= Não detectado; Glu - Glucose, Xil - Xilose, Fuc – Fucose e Ac. Glu. - Ácido glucurônico**

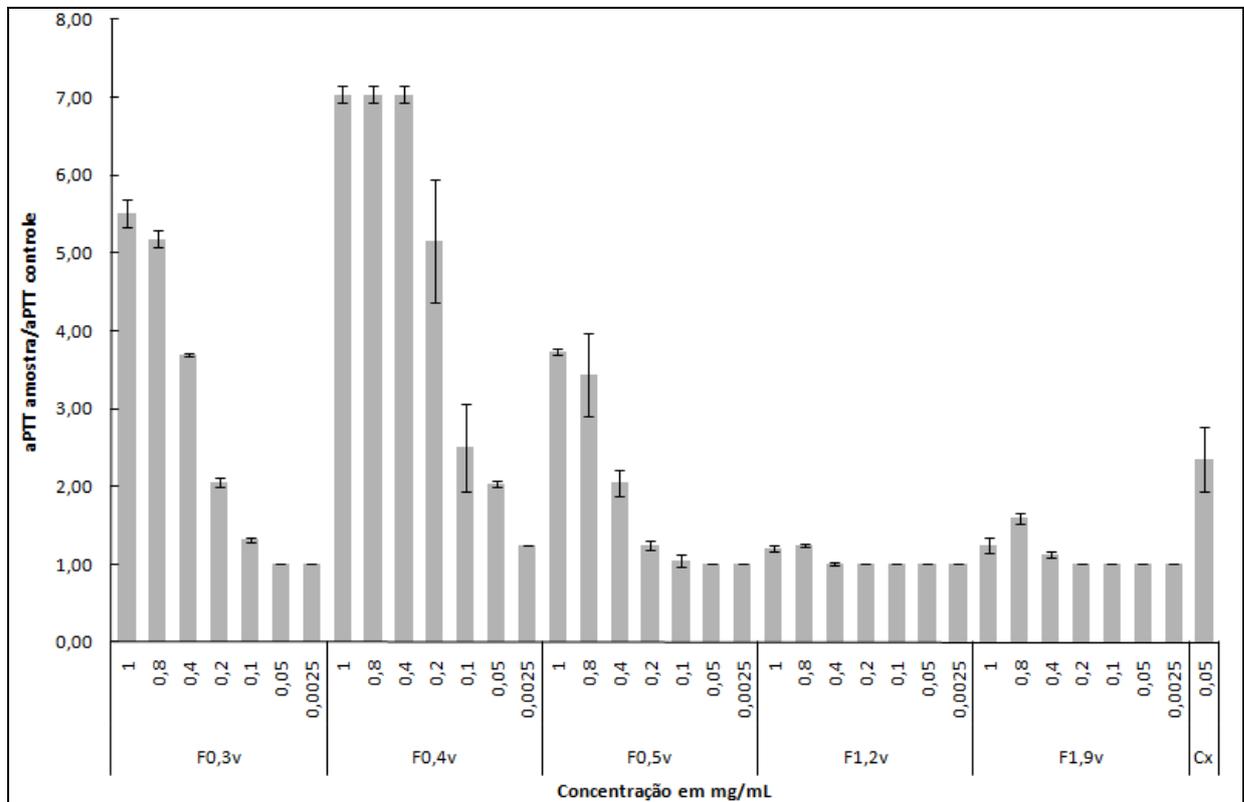
Quanto à composição monossacarídica mostrada também na tabela 1, pode-se observar que os polissacarídeos sulfatados das frações obtidas da *D. justii* são polímeros heterogêneos. Os dados mostraram que a glucose e a fucose são os monossacarídeos presentes em todas as frações, mas o percentual desses açúcares é diferente em cada polímero. Além disso, verificou-se uma maior heterogeneidade nas frações F0,3v e F0,4v, sendo essas constituídas de glucose, xilose, ácido glucurônico e fucose. Em contrapartida, a fração F0,5v e a F1,2v são mais homogêneas por apresentarem apenas dois monossacarídeos em sua composição. Elas são constituídas predominantemente de glucose (83% e 95,2%) e por uma menor porção de fucose (17% e 4,8%, respectivamente). A fração F1,9v, com relação a heterogeneidade, apresenta-se como intermediária entre as frações obtidas com valores baixos de acetona (F0,5v e F1,2v), já que ela é constituída de glucose, xilose e fucose.

Mediante essas informações fica claro que os valores percentuais destes açúcares podem variar de acordo com o polissacarídeo extraído. Pode-se inferir também, que devido a presença de fucose e sulfato nas frações F0,3v, F0,4v, F0,5v e F1,9v, que os polímeros presentes nessas frações são heterofucanas. Segundo Magalhães et al. (2011), algas marrons podem sintetizar fucanas sendo constituídas predominantemente por L-fucose, contendo pequenas quantidades de galactose, xilose, manose, glicose e ácido glucurônico, como também existem algas que possuem uma quantidade proporcionalmente menor de fucose do que outros componentes. Algas como *Laminaria japonica* (WANG et al., 2010), *Spatoglossum scrhöederi* (ROCHA, et al., 2005b) e *Sargassum stenophyllum* (DUARTE et al., 2001) também sintetizam um complexo sistema de heterofucanas.

Surpreendentemente, observou-se a presença de altas concentrações de glucose além de sulfato, na fração F1,2v. Como visto na figura 2, a F1,2v apresenta-se constituída da população C. Então, tal população é uma glucana sulfatada que, em algas marrons, ainda não tinham sido descritas na literatura sendo, portanto, esse é o primeiro relato.

### Atividade anticoagulante *in vitro*

A atividade anticoagulante *in vitro* dos polissacarídeos sulfatados (PS) das frações em estudo foi avaliada pelos ensaios de PT e aPTT. No teste de PT, o qual avalia a via extrínseca da cascata de coagulação, nenhuma das amostras de PS dobrou o tempo de coagulação até a massa de 100 µg, indicando a ausência de atividade para esse teste. Por outro lado, no teste de aPTT, cujo princípio é avaliar a via intrínseca e/ou comum da coagulação, os PS contidos nas frações F0,3v, F0,4v e F0,5v tiveram atividade anticoagulante (figura 03).



**Figura 3: Atividade anticoagulante (aPTT) dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha marrom *D. justii*. Os resultados foram expressos pela razão entre o tempo de coagulação da amostra pelo tempo de coagulação do controle negativo. Cada valor é uma média ± desvio-padrão de três determinações. Foram consideradas como anticoagulantes as concentrações que dobraram o tempo de coagulação (razão aPTTamostra/aPTTcontrole ≥ 2). Cx= Clexane®**

Os polissacarídeos sulfatados de cada fração tiveram comportamentos diferentes frente ao ensaio de aPTT. As frações F1,2v e F1,9v não apresentaram atividade anticoagulante. Enquanto que as frações F0,3v e F0,5v dobraram o tempo de coagulação nas concentrações de 0,2 mg/mL e 0,4 mg/mL. A fração com melhor atividade anticoagulante foi a F0,4v cujo tempo de coagulação foi dobrado numa concentração de apenas 0,05 mg/mL. Esse resultado foi similar ao encontrado para a Clexane®, uma heparina comercial de baixo peso molecular, que apresentou esse mesmo efeito com a mesma concentração de 0,05 mg/mL de plasma. Um fato interessante sobre as frações anticoagulantes é que ao se observar a figura 2, verifica-se que todas elas têm em comum a presença da população A em sua composição, o

que indica que essa população de PS é que apresenta atividade anticoagulante. Contudo, estudos futuros poderão confirmar essa hipótese.

O resultado observado aqui é melhor do que aquele verificado para fucanas das algas *Dictyopteris delicatula* (MAGALHÃES et al, 2011) e *Canistrocarpus cervicornis* (CÂMARA et al., 2011) que necessitaram de 0,010 mg para apresentarem atividade anticoagulante com potência semelhante a observada nesse trabalho. Fucanas de outras algas marrons apresentaram potência similar com massas ainda maiores (0,020 mg) como *Dictyota menstrualis* (ALBUQUERQUE et al, 2004) e *Padina gymnospora* (SILVA et al 2005). Esses mostram o grande potencial que as fucanas de *D. justii* têm como futuros compostos anticoagulantes.

Alguns autores correlacionam à ação anticoagulante exercida pelas fucanas ao grau de sulfatação e ao tamanho dos polímeros. Dessa forma, polímeros com maiores teores de sulfato e menores pesos moleculares apresentariam melhores atividades anticoagulantes (BOISSON-VIDAL et al., 2001). De fato, há exemplos de polissacarídeos sem atividade anticoagulante que, quando sulfatados artificialmente, passam a apresentar essa atividade (TELLES et al, 2011). Os dados aqui apresentados mostram que a fração mais sulfatada (F1,9v) não apresentou atividade anticoagulante, enquanto que a fração menos sulfatada (F1,4v) foi a mais potente anticoagulante. Esse pequeno paradoxo pode ser explicado pelo fato de que a simples presença dos grupos sulfatos não é o único fator necessário para que um PS apresente atividade anticoagulante, a distribuição e a posição de substituição dos grupamentos sulfato ao longo do PS também são importantes (NADER et al., 2004). Pretende-se em estudos futuros realizar a purificação dos PS anticoagulantes de *D. justii* e caracterizá-los estruturalmente a fim de se descobrir a relação estrutura/atividade destes PS.

## CONCLUSÃO

A alga marrom *Dictyopteris justii* sintetiza pelos menos três populações de polissacarídeos sulfatados que foram denominados de populações A, B e C de acordo com suas mobilidades eletroforéticas. As populações A e B são heterofucanas sulfatadas e a população C é uma glucana sulfatada. Essas populações de polissacarídeos foram agrupadas em diferentes frações polissacarídicas com uso de precipitação com acetona. As frações F0,3v, a F0,4v e a F0,5v, com destaque para a F0,4v, foram as que apresentaram atividade anticoagulante.

## REFERÊNCIAS

1. ALBUQUERQUE, I. R. L. et al... Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S.l.], v. 37, n. 2, p. 167-171, 2004.
2. ALMEIDA-LIMA, J; COSTA, L. S. ; SILVA, N. B. ; SILVEIRA, R. F. M. ; SILVA, F. V. ; FELIPE, M. B. M. C. ; BATISTUZZO, S. R. ; LEITE, E. L. ; ROCHA, H. A. O. . **Evaluating the possible genotoxic, mutagenic and tumor cell proliferation-inhibition effects of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan**. **JAT. Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 708-715, 2010.
3. BARROSO, E. M. A. et al... A non anticoagulant heterofucan has antithrombotic activity *in vivo*. **Planta Medica**, [S.l.], v. 74, p. 712-718, 2008.

4. BEYER T, M. M, BRINZ D, RÄDLER O, WOLF B, NORWIG J, BAUMANN K, ALBAN S, Holzgrabe U. Composition of OSCS-contaminated heparin occurring in 2008 in batches on the German market. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 40, 297–304, 2010.
5. BOISSON-VIDAL, C. et al. Relationship between antithrombotic activities of fucans and their structure. **Drug Development Research**, [S.l.], v. 51, p. 216-224, 2001.
6. BRADFORD, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254. 1976.
7. CAMARA, R.B.G.; COSTA, L.S.; FIDELIS, G.P.; NOBRE, L.T.D.B.; DANTAS-SANTOS, N.; CORDEIRO, S.L.; COSTA, M.S.S.P.; ALVES, L.G.; ROCHA, H.A.O. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. **Mar. Drugs** 2011, 9, 124–138.
8. COSTA, L. S. ; FIDELIS, G. P. ; CORDEIRO, Sara Lima ; OLIVEIRA, R. M. ; SABRY, D. de A. ; CAMARA, R. B. G. ; NOBRE, L. T. D. B. ; COSTA, M. S. S. P. da ; LIMA, J. A. de ; FARIAS, E. H. C. de ; LEITE, E. L. ; ROCHA, H. A. O. . Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21-28, 2010.
9. COSTA, M.S.S.P. **Efeito da salinidade da água do mar no rendimento, composição e atividades biológicas de frações polissacarídicas da Chlorophyta *Caulerpa cupressoides* va. *Flabellata***. 89f. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2010.
10. DIETRICH, C. P. *et al.* A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**, [S.l.], v. 108, p. 143-153, 1995.
11. DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.
12. DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemistry Journal**, [S.l.], v. 84, p. 106-110, 1962.
13. DUARTE, M. E. R. *et al.* Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydrate Research**, [S.l.], v. 333, p. 281-293, 2001.
14. DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
15. HOLTkamp, A.D, KELLY, S., ULBER, R., LANG S. Fucoidans and fucoidanases: focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. **Appl Microbiol Biotechnol** 82: 1–1, 2009.
16. HUSSEIN, M. M. D. et al. Some structural features of a new sulphated heteropolysaccharide from *Padina pavonia*. **Phytochemistry**, [S.l.], v. 19, p. 2133-2135, 1980.
17. LI, B., LU, F., WEI, X., ZHAO, R. Fucoidan: structure and bioactivity. **Molecules**, v. 13, p. 1671–1695, 2008.
18. LIBBY P., RIDKER, P. M e Hansson G. K. **Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis**. *Nature* 2011, VOL 473. 317-325
19. MAGALHAES, K. D. ; COSTA, L. S. ; FIDELIS, G. P. ; OLIVEIRA, R. M. ; NOBRE, L. T. D. B. ; SANTOS, N. D. dos ; CAMARA, R. B. G. ; ALBUQUERQUE, I. R. L ; CORDEIRO, S. L. ; SABRY, D. de A. ; COSTA, M. S. S. P. da ; ALVES, L. G. ; ROCHA, H. A. O. . Anticoagulant, Antioxidant and Antitumor Activities of

- Heterofucans from the Seaweed *Dictyopteris delicatula*. **International Journal of Molecular Sciences** (Online), v. 12, p. 3352-3365, 2011
20. 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 Pharmaceutical Design**, [S.l.], v. 10, p. 951-966, 2004.
21. ROCHA, H. A. O. ; FRANCO, C. R. C. ; TRINDADE, E. S. ; CARVALHO, L. C. M. ; VEIGA, S. S ; LEITE, E. L. ; DIETRICH, C. P. ; NADER, H. B. . A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schoederi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brasil, v. 34, p. 621-626, 2001.
22. ROCHA, H. A. O. ; FARIAS, Eduardo Henrique Cunha de ; BEZERRA, Luana Cristina Lins de Medeiros ; ALBUQUERQUE, Ivan Rui L ; MEDEIROS, Valquíria P ; QUEIROZ, Karla Cristina S. ; LEITE, Edda Lisboa . **Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante** . Infarma (Brasília), v. 16, n. 1-2, p. 82-87, 2004.
23. ROCHA, H. A. O. *et al.* Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schröderi*. An ideal antithrombotic agent? **Journal of Biological Chemistry**, [S.l.], v. 280, p. 41278-41288, 2005a
24. ROCHA, H. A. O. *et al.* **A xylogalactofucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* stimulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial.** *Planta Medica*, [S.l.], v. 71, n. 4, p. 379-81, 2005b
25. SILVA, T. M. A. *et al.*... Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S.l.], v. 38, p. 523-533, 2005.
26. TELLES, C. B. ; SABRY, D. A. ; LIMA, J. A. de ; COSTA, M. S. S. P. da ; SILVEIRA, R. F. M. ; TRINDADE, E. S. ; SASSAKI, G. L. ; WISBECK, E. ; FURLAN, S. A. ; LEITE, E. L. ; ROCHA, H. A. O. Sulfation of the extracellular polysaccharide produced by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* alters its antioxidant, anticoagulant and antiproliferative properties in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 514-521, 2011.
27. VIDAL, A. A. J. ; NOBRE, L. T. D. B. ; SANTOS, N. D. dos ; LIMA, J. A. de ; ROCHA, H. A. O. . Comparação do efeito de diferentes solventes no fracionamento de polissacarídeos sulfatados da alga parda *Spatoglossum schroederi* (C. Agardh) Kützing. **Publica (UFRGN)**, v. 6, p. 46-54, 2010.
28. WANG, J. *et al.*... Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 46, p. 6-12, 2010.
29. WEITZ, D. S.; WEITZ, J. I. Update on heparin: what do we need to know? **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, [S.l.], v. 29, p. 199-207, 2010.
30. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control 2011**. Geneva: World Health Organization, 2010.