

Comparação do efeito de diferentes solventes no fracionamento de polissacarídeos sulfatados da alga parda *Spatoglossum schroederi* (C. Agardh) Kützing

Arthur Anthunes Jacome Vidal¹, Leonardo Thiago Duarte Barreto Nobre², Jailma Almeida Lima³, Nednaldo Dantas-Santos³, Hugo Alexandre Oliveira Rocha⁴

¹Aluno de IC voluntário, ²Biomédico, mestrando do Programa de Pós-graduação em Bioquímica, ³Biólogo(a), Doutorando (a) do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, ⁴Professor Orientador do Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Resumo

Polissacarídeos sulfatados (fucanas) da alga *Spatoglossum schroederi* foram extraídos por proteólise e submetidos ao um fracionamento com propanona, etanol ou metanol, a fim de se comparar a capacidade de fracionamento de cada um. Análises químicas e eletroforéticas mostraram que todos os solventes foram capazes de fracionar as fucanas. Contudo, a propanona proporcionou um maior rendimento e conseguiu isolar cada tipo de fucana das demais fucanas sintetizadas pela alga. Os dados indicam que o fracionamento utilizando solventes orgânicos pode ser uma importante ferramenta para a purificação de polissacarídeos sulfatados.

Palavras-chave: Fucana, Alga marrom, Purificação

Abstract

Fucans, sulfated L-fucose-rich polysaccharides, have shown several biological activities, such as anticoagulant, antioxidant and antitumor activities. In this study fucans from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* were extracted by proteolysis and subjected to propanone, ethanol or methanol fractionation in order to compare the fractionation capacity of each solvent. Chemical and electrophoretic analysis showed that all solvents were able to fractionate fucans. Propanone provided a higher yield. In addition, it was the only solvent capable of isolating the three types of fucans synthesized by the seaweed. The data indicate that inorganic solvent fractionation is a useful tool for sulfated polysaccharide purification.

Keywords: Fucan, Brown seaweed, Purification

Introdução

Os polissacarídeos constituem um dos quatro grupos de macromoléculas que compõem os seres vivos. Quantitativamente, seus principais representantes são a celulose e a quitina, duas das mais abundantes moléculas orgânicas do planeta. Nas últimas décadas, um grupo específico de polissacarídeos vem chamando a atenção de vários pesquisadores por apresentarem uma gama de atividades farmacológicas: o grupo dos polissacarídeos sulfatados (PS) (LI et al., 2008).

Os PS não são encontrados em todos os seres vivos; os principais organismos sintetizadores dessas moléculas são os animais (MEDEIROS et al., 2000) e as macroalgas marinhas (LI et al., 2008). Estas produzem um número e quantidade bem maior de diferentes tipos de PS do que os animais (ROCHA et al., 2006).

Cada classe de algas (vermelha, parda e verde) sintetiza PS que lhes são peculiares. As algas pardas produzem as fucanas, que são PS que apresentam o mosossacarídeo sulfatado L-fucose na sua constituição. As fucanas podem ser encontradas na forma de homopolímeros e de heteropolímeros; nesse caso também são chamadas de fucoidan (LI et al., 2008). A esses polímeros são atribuídas diversas atividades biológicas, como: anticoagulante, antioxidante, antiproliferativa, antitumoral, antiviral, antiinflamatória, antimetastática, antiulcerativa, angiogênica (ROCHA et al., 2006; LI et al., 2008). Esse grande leque de atividades é atribuído à diversidade estrutural que esses polímeros apresentam devido ao fato de existirem muitas possibilidades de interação entre as oses e os grupos sulfato, o que faz com que mesmo homopolímeros apresentem estruturas complexas (ROCHA et al., 2006; LI et al., 2008). Assim, cada fucana pode apresentar uma conformação estrutural única e, portanto, possuir atividades farmacológicas diferentes e/ou mais potentes do que outras fucanas ou outros compostos já descritos. Então, a caracterização de uma nova fucana traz sempre novas perspectivas de descoberta de um novo fármaco ou de um novo composto a ser utilizado por diversas indústrias, como: química, farmacêutica ou alimentícia (COSTA et al., 2010).

A alga *Spatoglossum schroederi* sintetiza três heterofucanas, que foram denominadas de fucanas A, B e C. A fucana A é uma xiloglucoranofucana (LEITE et al., 1998), enquanto que as fucanas B e C são duas galactofucanas (ROCHA et al., 2005). Essas fucanas, apesar de não possuírem atividade anticoagulante *in vitro*, apresentam atividade antitrombótica *in vivo* (ROCHA et al., 2005; BARROSO et al., 2008), o que é um fato raro, pois quando se analisam fármacos anticoagulantes eles não apresentam essa característica. Recentemente, foi demonstrado que um extrato aquoso rico em fucanas dessa mesma alga apresentou atividade antioxidante em vários testes (COSTA et al., 2010), o que veio a aumentar o potencial farmacológico das fucanas da alga *S. schroederi*.

Durante o processo de obtenção dessas fucanas há uma dificuldade de purificá-las entre si. Foi proposta a precipitação diferencial dessas fucanas com o uso de volumes crescentes de propanona como passo inicial no processo de sua purificação (ROCHA et al., 2005). Contudo, outros solventes não foram avaliados. Portanto, o principal objetivo deste trabalho foi comparar a capacidade de propanona, metanol ou etanol em promover a separação das diferentes fucanas encontradas na alga *S. Schroederi*, utilizando análises químicas e eletroforese em gel de agarose.

Material e Métodos

Extração dos polissacarídeos

A alga *Spatoglossum schroederi* (C. Agardh) Kützing (Phaeophyceae-Dictyotales) foi coletada na praia de Búzios, Nísia Floresta-RN, no mês de março de 2010. As algas foram limpas e secas em estufa aerada a 45° C. Após trituração, o material foi submetido ao processo de extração dos polissacarídeos. Para a realização dessa etapa, foram adicionados dois volumes de NaCl 0,25 M ao material (60 g), tendo essa solução seu pH ajustado para 8,0 com NaOH. A esse material foi adicionada a enzima proteolítica Maxatase (15 mg por grama de alga) e essa suspensão permaneceu a 60°C, sob agitação constante, durante 24h. Os polissacarídeos em algas estão associados às proteínas e isso dificulta a sua solubilização em soluções aquosas: o uso da maxatase promoverá a degradação destas proteínas e facilitará a extração dos polissacarídeos algais. Outro benefício do uso da maxatase é que esta degradará também as proteínas solúveis no extrato e assim eliminará esse contaminante.

Após o período de incubação, o material foi centrifugado (10.000 x g, 10 min., 4° C) e o sobrenadante, contendo as fucanas, foi dividido em três recipientes, cada um contendo igual volume. O recipiente 1 foi submetido a um fracionamento com volumes crescentes de propanona, o recipiente 2, a um fracionamento com volumes crescentes de etanol e o recipiente 3, a um fracionamento com volumes crescentes de metanol. Inicialmente foram adicionados 0.5 volumes do solvente. Após 12 h, o precipitado foi separado da solução por centrifugação (10.000 x g, 10 min., 4° C), secado e armazenado para as análises seguintes. Ao sobrenadante obtido após essa etapa adicionou-se mais solvente até se obter a turvação do material. Esse procedimento foi repetido com volumes crescentes do solvente até não se conseguir mais a turvação do sobrenadante.

Análises químicas

A quantificação dos polissacarídeos extraídos foi realizada como descrito por Dubois et al. (1956) e a L-fucose foi utilizada como padrão. As proteínas e os ácidos urônicos foram quantificados segundo Leite et al. (1998).

Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses foram realizadas em gel de agarose com tampão PDA (1,3 diamino propano acetato) como descrito em Rocha et al. (2005).

Resultados e Discussão

A alga *S. schroederi* foi coletada na praia de Búzios-RN de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. Após o processo de proteólise, o extrato polissacarídico foi submetido ao fracionamento diferencial com volumes crescentes de solvente orgânico, obtendo-se assim sete (propanona) ou seis (metanol ou etanol) frações polissacarídicas (Tabela 1). A diferença entre o número de frações e o tipo de polissacarídeo encontrado em cada uma se dá devido à forma como cada solvente altera a constante dielétrica da solução e assim promove a precipitação dos PS (VOLPI, 1994).

Tabela 1. Rendimento dos constituintes glicídicos e protéicos das frações obtidas após precipitação com diferentes solventes.

Solvente	Fração	Rendimento (mg)	Açúcar (mg)	Proteína (mg)
ACETONA	A0.5	966,0	97,0	53,0
	A0.6	522,0	261,0	5,0
	A0.7	215,0	72,0	5,0
	A0.9	136,0	45,0	5,0
	A1.1	77,0	26,0	2,0
	A1.3	81,0	28,0	3,0
	A2.0	9,0	3,0	0,0
	Σ	2006,0	532,0	73,0
METANOL	M0.5	695,0	45,0	1,0
	M0.7	136,0	35,0	1,0
	M0.9	188,0	70,0	1,0
	M1.1	147,0	20,0	0,0
	M1.5	65,0	16,0	0,0
	M2.0	67,0	10,0	0,0
	Σ	1298,0	196,0	3,0
	ETANOL	E0.5	843,0	170,0
E0.7		116,0	30,0	1,0
E0.9		43,0	7,0	0,0
E1.3		52,0	10,0	1,0
E1.7		144,0	15,0	2,0
E2.0		21,0	1,0	0,0
Σ		1219,0	233,0	48,0

Com o uso de qualquer um dos solventes, a primeira fração obtida (A0.5; M0.5 ou E0.5) foi a que apresentou um maior rendimento em massa em comparação com as demais frações obtidas com o mesmo solvente. Porém, foi a que apresentou maior quantidade do contaminante protéico. Quando o teor de ácidos urônicos foi medido nessas frações, ele variou de 30 a 40%. Leite et al. (1998) mostrou que *S. schroederi* sintetiza altas quantidade de alginatos, polissacarídeos ricos em ácidos glucurônicos; em conjunto, esses dados indicam que as frações A0.5, M0.5 ou E0.5 são ricas em alginatos.

Observa-se na tabela 1 que a propanona foi o solvente que precipitou mais material (2006,0 mg), e que os valores obtidos com etanol e metanol são muito semelhantes (1298 e 1219 mg, respectivamente). O mesmo foi observado com relação à quantidade de carboidratos. Aproximadamente 50% do material precipitado pela

propanona é açúcar, enquanto que com os demais solventes só se obteve um valor em torno de 20% para esse constituinte.

Os resultados obtidos no presente trabalho (Tabela 1) mostram também que as fucanas da alga *Spatoglossum schroederi* possuem contaminação com proteínas, principalmente as primeiras frações, A0.5 e E0.5, obtidas da extração com acetona e etanol, respectivamente. Contudo, vale salientar que o metanol foi o solvente que proporcionou o menor grau de contaminação protéica. Geralmente, as fucanas extraídas de algas encontram-se contaminadas com proteínas. A variabilidade do teor protéico nas fucanas está relacionada ao método de extração e à espécie de alga analisada. Hussein et al. (1980) encontraram em fucanas de *Padina povonia* um elevado teor de proteínas (67%). Contudo, esses autores não utilizaram a proteólise como passo inicial para a extração desses polissacarídeos. Quando a proteólise foi utilizada, valores bem baixos desse contaminante foram geralmente observados, como aqueles apresentados por Detrich et al. (1995), que obtiveram da alga *Padina gymnospora* frações polissacarídicas com valores de proteínas compreendidos entre 1,6-7,5%. Nosso resultado reforça os dados descritos na literatura.

A eletroforese em gel agarose em tampão PDA foi proposta como ferramenta para estudo de polissacarídeos sulfatados na década de 70 (Rocha et al., 2005). Ela é uma técnica barata, de fácil execução e reproduzível. Portanto, ela foi utilizada neste trabalho para se observar a homogeneidade das frações polissacarídicas após a precipitação com os solventes orgânicos. Na figura 1 tem-se o perfil eletroforético dos polissacarídeos sulfatados encontrados nas frações.

O perfil eletroforético dos componentes das frações obtidas pelos solventes é bastante diferente. Enquanto que com o uso da propanona a fucana A é encontrada principalmente naquelas frações obtidas com menores volumes de solvente (P0.5 e P0.6), com o uso de metanol ou etanol ela só não é encontrada na fração de maior volume (E2.0 e M2.0). Com relação à fucana B se observa que com o uso da propanona ela foi obtida nas frações intermediárias; já com os outros solventes ela só foi obtida nas duas últimas frações. O etanol não conseguiu precipitar a fucana C. Outro fato importante é que, ao se observar o perfil das frações P0.6, P0.9 e P2.0, se identifica cada uma das fucanas parcialmente purificadas, o que indica que só a propanona conseguiu separar parcialmente as fucanas da alga *S. schroederi*.

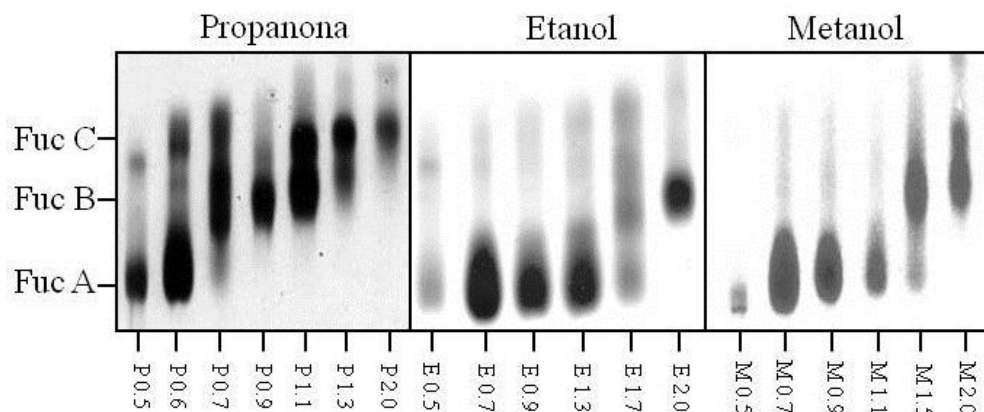


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA das frações polissacarídicas obtidas da alga *Spatoglossum schroederi*.

Essas frações foram obtidas a partir do acréscimo de diferentes volumes do solvente, como descrito em métodos. Cerca de 50 μ g 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. Fuc A, Fuc B e Fuc C correspondem, respectivamente, às fucanas A, B e C.

Os dados aqui apresentados demonstraram que diferentes solventes podem fracionar PS oriundos de algas. Contudo, as análises químicas e eletroforéticas mostraram que o perfil de fracionamento não é semelhante. Cada alga produz PS que lhe são próprios, e que, portanto, podem ser fracionados de forma diferente de acordo com o solvente utilizado. Isso indica que não existe um solvente mais apropriado para fracionar PS de algas e que sempre se deve avaliar o solvente mais apropriado de acordo com a alga em estudo, o que, conseqüentemente, levará a uma purificação mais rápida do PS, diminuindo assim os custos de sua obtenção.

Conclusão

Diferentes solventes orgânicos podem ser utilizados para fracionar polissacarídeos sulfatados de algas. Contudo, a forma como cada solvente separa os PS é diferente. No caso de PS da alga *S. schroederi*, a propanona se mostrou mais eficiente do que o metanol e o etanol. Essa acetona conseguiu precipitar mais carboidratos do que os demais solventes, bem como conseguiu separar as três fucanas sintetizadas por essa

alga, algo que os demais solventes não conseguiram. Todavia, o metanol foi o que proporcionou o menor grau de contaminação protéica.

Referências

BARROSO, E. M. A., COSTA, L. S., MEDEIROS, V. P., CORDEIRO, S. L., COSTA, M. S. S. P., FRANCO, C. R. C., NADER, H. B., Leite, E. L., ROCHA, H. A. O. A Non-Anticoagulant Heterofucan has Antithrombotic Activity *in vivo*. **Planta Medica**, v. 74, p. 712-718, 2008.

COSTA, L. S., FIDELIS, G. P., CORDEIRO, S. L., OLIVEIRA, R. M., SABRY, D. A., CÂMARA, R. B. G., Nobre, L. T. D. B., COSTA, M. S. S. P., ALMEIDA-LIMA, J., FARIAS, E. H. C., LEITE, E. L., ROCHA, H. A. O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21–28, 2010.

DIETRICH, C.P., FARIAS, G.G.M., ABREU, L.R.D., LEITE, E.L., SILVA, L.F., NADER, H.B. A new approach for the characterization of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**, v.108, p. 143-153, 1995.

DUBOIS, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350 -356, 1956.

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.

LEITE, E. L., MEDEIROS, M. G. L., ROCHA, H. A. O., FARIAS, G. G. M., da Silva, L. F., CHAVANTE, S. F., de Abreu, L. D., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröderi*. **Plant Science**, v. 132, p. 215–228, 1998.

LI, B., LU, F., WEI, X., ZHAO, R. Fucoïdan: structure and bioactivity. **Molecules**, v. 13, p. 1671–1695, 2008.

MEDEIROS, G. F., MENDES, A., CASTRO, R. A., BAÚ, E. C., NADER, H. B., DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochemistry and Biophysic Acta**, v. 26, p. 287-94, 2000.

ROCHA, H. A. O., MORAES, F. A., TRINDADE, E. S., FRANCO, C. R. C., TORQUATO, R. J. C., VELGA, S. S., VALENTE, A. P., MOURÃO, P. A. S., LEITE, E. L., NADER, H. B., DIETRICH, C. P. Structural and Hemostatic Activities of a Sulfated Galactofucan from the Brown Alga *Spatoglossum schröderi* An Ideal Antithrombotic Agent?. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 41278–41288, 2005.

ROCHA, H. A. O., LEITE, E. L., MEDEIROS, V. P., LOPES, C. C., NASCIMENTO, F. D., TERSARIOL, I. L. S., SAMPAIO, L. O., NADER, H. B. Natural sulfated

polysaccharides as antithrombotic compounds. Structural characteristics and effects on the coagulation cascade. In **Carbohydrate Structure and Biological Function**. Kerala: Transworld Research Network, 2006.

VOLPI, N. Structural analysis and physico-chemical properties of charge-fractionated dermatan sulfate samples. **Carbohydrate Research**, v. 260, p. 159-67, 1994.

Arthur Anthunes Jacome Vidal

Endereço eletrônico: arthur_bio@hotmail.com

Grupo de Pesquisa: Glicoconjugados: Estrutura e Atividades Farmacológicas

Endereço postal: Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário, Natal/RN 59078-970 – Brasil