

# CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AÇÃO FARMACOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA MARINHA *AMANSLA MULTIFIDA*

LEONARDO AUGUSTO RÊGO SOUZA<sup>1</sup>  
TARCIANA CARVALHO GURGEL AZEVEDO<sup>2</sup>  
FERNANDO ROBERTO FERREIRA SILVA<sup>2</sup>  
MARIA LEILA CARDOSO<sup>2</sup>  
CAROLINE ADDISON CARVALHO XAVIER<sup>2</sup>  
HUGO ALEXANDRE OLIVEIRA ROCHA<sup>2</sup>  
CELINA MARIA PINTO GUERRA DORE<sup>2</sup>  
EDDA LISBOA LEITE<sup>2</sup>

1. Graduando do curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, RN.
2. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Centro de Biociências, Campus Universitário, Natal, RN.

Autor responsável: E.L. Leite. Email: eddaleite@cb.ufrn.br

## INTRODUÇÃO

As algas marinhas são de extrema importância para o ecossistema, pois são responsáveis por quase todo oxigênio produzido em nosso planeta. Elas podem apresentar diversas utilidades no dia-dia, seja na alimentação, na indústria, agricultura, microbiologia e cosméticos. As algas estão classificadas em três grupos principais: *Clorofíceas* ou algas verdes, *Feofíceas* ou algas pardas e *Rodofíceas* ou algas vermelhas. Esta última vem despertando o interesse de pesquisadores devido o largo emprego na indústria alimentícia devido aos polissacarídeos.

As carragenanas são polissacarídeos extraídos de algas vermelhas, descobertas no século passado, a partir de *Chondrus crispus*. Esta espécie de alga era bastante utilizada pela população de Carrageen, cidade costeira da Irlanda, como agente espessante (substância que aumenta a viscosidade de um alimento), ou ainda, devido a sua funcionalidade referente à viscosidade e capacidade de gelificação, conferindo textura aos alimentos caseiros. Embora o primeiro estudo publicado sobre carragenanas tenha sido realizado em 1844 (Schmidt, 1955), até o presente estes polissacarídeos tem sido objeto de estudos com respeito a sua estrutura química, propriedades físico-químicas, variações intra e interespecíficas e aplicações industriais.

Vários estudos demonstraram diversas atividades farmacológicas desses polímeros sulfatados de algas vermelhas, dentre elas destacam-se: atividade antimicrobiana, antiviral e anticoagulante. Além disso, as carragenanas vêm sendo utilizadas como ferramentas para investigar o processo inflamatório em ratos e camundongos (Levy, 1969), uma vez que são indutoras deste processo. Quando injetadas subcutaneamente na superfície plantar de uma

pata de rato, provocam uma inflamação característica, que pode ser usada para quantificar o poder de ação de drogas antiinflamatórias (Henriques et al., 1987; Salvemini et al., 1996; Sammons et al., 2000, Cuzzocrea et al., 1998). Os polissacarídeos de algas vermelhas são constituídos basicamente de monômeros sulfatados de D-galactose ligados alternadamente com  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Além da galactose e sulfato, outros resíduos de carboidratos como xilose, glicose, ácidos urônicos podem estar presentes em baixas quantidades em preparações da carragenanas (Van de Valde et al., 2004). Estas galactanas sulfatadas são classificadas de acordo com a presença de 3,6-anidrogactose, posição e número de grupos sulfato (Rees, 1969; McCandless & Craigie 1979).

Neste trabalho, foram extraídos polissacarídeos da alga vermelha *Amansia multifida*, comum no litoral brasileiro, com o objetivo de caracterizar quimicamente por eletroforese os seus constituintes. Subseqüentemente, nosso objetivo foi o de caracterizar a possível propriedade farmacológica anticoagulante destes polissacarídeos.

## MATERIAL E MÉTODOS

A alga utilizada para o estudo foi coletada na praia de Búzios (RN) durante a maré baixa, sendo posteriormente catalogada pela Dra. Heliane Marinho Soriano do Departamento de Oceanografia e Limnologia da UFRN. Logo após a coleta, as algas foram limpas e secas em estufa a 45°C, depois foram trituradas e submetidas a três deslipidações com três volumes de acetona durante 6 horas, para que houvesse a retirada de contaminantes lipídicos e polifenólicos. Após este procedimento a acetona foi decantada e

a alga seca a temperatura ambiente. A partir deste ponto obteve-se o que chamamos de pó cetônico o qual foi submetido à extração das frações polissacarídeas.

Foi realizada com o pó cetônico uma proteólise para a retirada de substâncias protéicas, aumentando a solubilidade dos polissacarídeos, para isso foi utilizado enzima maxatase (0,15 mg/g de alga) em 600mL de solução de NaCl 0,25M à 60°C em pH 8,0 durante 12 horas. Em seguida, o material foi centrifugado (1000 x g) e o sobrenadante obtido (cru de polissacarídeos) foi fracionado com volumes crescentes de acetona, a fim de obter diferentes frações polissacarídicas. De início foi adicionado 1,0 volume de acetona (Merck) à solução a 4°C durante 18 horas. Após centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos, o precipitado foi secado a vácuo. Este processo foi repetido para obtenção de três frações: F1, F2 e F3. Para obtenção da fração FT foi adicionado ao extrato de polissacarídeos 5,0 volumes de acetona e resto do processo foi repetido. Todo o esquema de fracionamento encontra-se na figura 1.



**Figura 1.** Esquema de fracionamento das frações polissacarídicas da alga *Amansia multifida*

### Determinações químicas

A dosagem de açúcares totais foi realizada pelo método do fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956), empregando-se como padrão L-galactose como monossacarídeo padrão. As leituras foram realizadas a 490 nm. As proteínas foram determinadas com o reagente de Croomassie blue R segundo o método de Spector (1978) e a leitura realizada a 595 nm, empregando-se como padrão albumina de soro bovina. O teor de sulfato total foi determinado, após hidrólise ácida (HCl 8N, 6 horas, 100°C), por turbidimetria pelo método da gelatina-bário (Dodgson & Price, 1962). O sulfato de sódio (1 mg/mL) foi utilizado como padrão sendo submetido às mesmas condições das amostras em estudo.

Eletroforese em gel de agarose foi realizada pelo método descrito por Dietrich & Dietrich.

### Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho foi realizada em espectrofotômetro FT-IR ABB Bomem modelo MB 104, de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>. Os polissacarídeos (5 mg) foram analisados após secagem sob a forma de pastilha de KBr.

### Atividade anticoagulante

Atividade anticoagulante foi realizada pelo tempo parcial de tromboplastina ativada (APTT), que está relacionado com a via intrínseca da coagulação. O teste foi realizado com os "kits" obtidos comercialmente (Labtest). Além das frações da alga *Amansia multifida* foram utilizadas mais três algas comerciais chamadas de kappa (Tipo III, C-1263) – extraída da alga *Eucheuma cottonii*, lambda (Tipo VI, C-3889) – extraída das algas *Gigartina aciculaire* e *Gigartina pisillata* e iota (Tipo V, C-3799) – extraída da alga *Eucheuma spinosa*.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o processo de extração obtivemos os diferentes polissacarídeos sulfatados que denominamos de F1, F2, F3 e FT. As análises químicas mostraram teores de polissacarídeos, proteínas e sulfato e todas as frações. Na tabela 1 encontram-se os resultados das análises.

**Tabela 1.** Análises químicas das frações polissacarídicas da alga *Amansia multifida*.

Frações de <i>A. multifida</i>	Açúcares totais <sup>a</sup> (%)	Proteínas <sup>b</sup> (%)	Sulfato <sup>c</sup> (%)
FT	54.3	10.7	40.0
F1	86.5	7.0	6.5
F2	54.6	10.8	34.6
F3	29.5	11.7	58.9

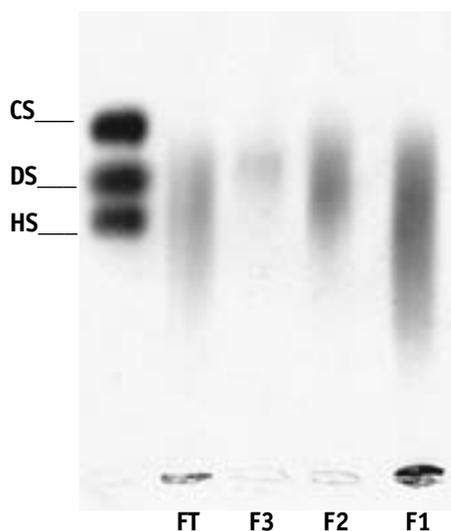
a – Spector, 1978.

b – Dubois et al., 1956.

c – Método turbidimétrico (Dodgson e Price, 1962).

Os resultados demonstram uma grande quantidade de polissacarídeos nas amostras, principalmente na F1 com 86,5%. Por outro lado, os teores de proteínas estavam compreendidos entre 7,0 a 11,66% (tabela 1). Os baixos teores de proteínas observados revelaram uma boa eficácia na ação da enzima proteolítica. A tabela 1 mostra também a presença de sulfato em todas as frações. As frações FT e F3 apresentaram 40% e 58,9%, respectivamente. Por outro lado, a fração F1 apresentou menor quantidade de sulfato (6,5%) em relação às demais frações.

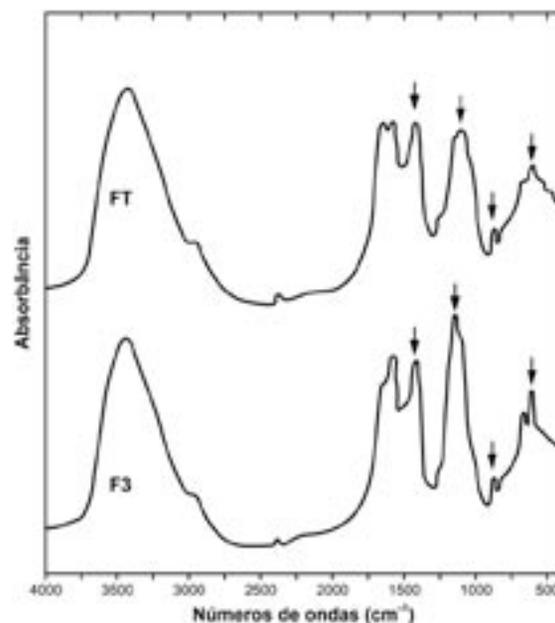
A eletroforese em gel de agarose em tampão PDA (1,3 diâmino propano acetato) é um importante método, pois nos fornece dados sobre as cargas e homogeneidade dos polímeros. As estruturas sulfatadas interagem com a diamina e são posteriormente precipitadas com o cetavlon (CTV 0,1%). A visualização é feita com um corante denominado de azul de toluidina. Os polissacarídeos, objetos deste estudo, apresentaram certa polidispersividade, comuns em carboidratos complexos e diferentes migrações eletroforéticas. Na figura 2, estão demonstrados os perfis eletroforéticos das quatro frações de carragenanas.



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose em tampão PDA das frações da *Amansia multifida*. Há uma polidispersão nas frações, o que comprova a presença de mais de uma população de polissacarídeos. **CS:** Condroitim sulfato, **HS:** Heparan Sulfato, **DS:** Dermatam sulfato.

A espectroscopia de infravermelho (IR) tem sido largamente usada na caracterização de diversos compostos, inclusive, carragenanas. Isto é de fundamental importância não só na caracterização de alguns grupos funcionais, como nas modificações químicas induzidas em alguns polímeros. É um método rápido, não destrutivo e que requer apenas pequena quantidade de amostra (5mg). Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram absorção encontrada nas frações F3 e FT (tabela 2).

Os espectros de infravermelho das frações F3 e FT utilizadas nesse trabalho são mostradas na figura 3. Nos dois espectros observam-se bandas de absorção típicas por volta de  $1290\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde aos grupos éster-sulfato (tabela 2). Apresentam também em ambos absorção na região de  $843\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a galactose-4-sulfato, em  $908\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao grupo C-6 na  $\beta$  D-galactose, também encontrada nas duas frações polissacarídicas. O grupo funcional  $\text{O}=\text{S}=\text{O}$  pode ser evidenciado por duas absorções de ondas ( $1290$  e  $594\text{ cm}^{-1}$ ) nas duas frações, confirmando mais ainda a presença desse grupo funcionas nas amostras. A presença do grupamento sulfato nestes polissacarídeos e confirmada pela absorção na região de  $1400\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 3.** Espectro de infravermelho das frações F3 e FT.

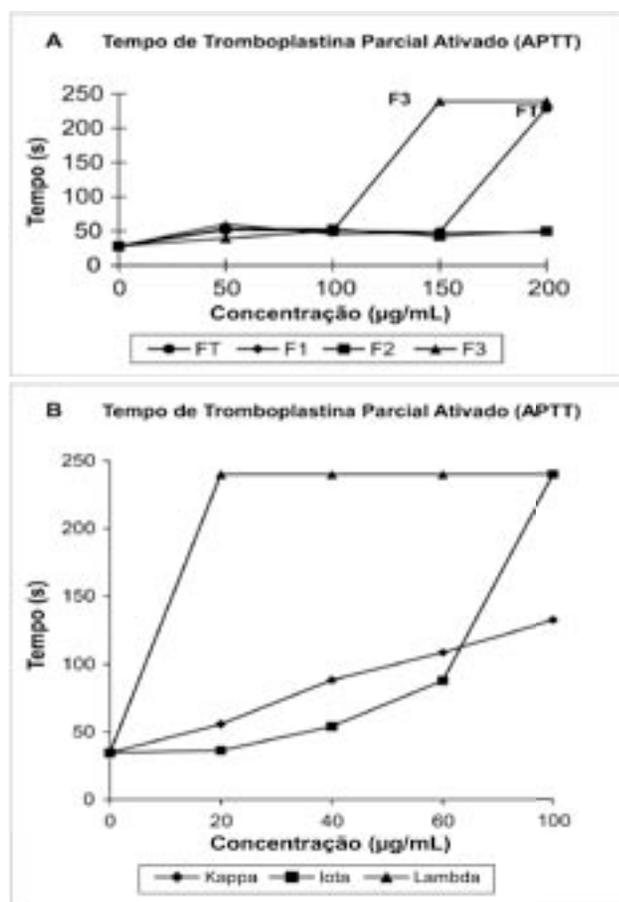
**Tabela 2.** Bandas absorvidas no espectro infravermelho nas frações F3 e FT e seus respectivos grupos funcionais

Comprimento de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupos funcionais	Referências
3400-3000	O-H (deslocamento)	B
1400	Grupo Sulfato	E
1100	S-O (deslocamento assimétrico)	C
866	Grupo $\text{C}_4\text{-O-S}$ da galactose (deslocam.)	A, B
594	$\text{O}=\text{S}=\text{O}$	B
908	Grupo C6 da D-galactose	B, D

- A – CHOPIN & WHALEN, 1993.
- B – SEKKAL & LEGRAND, 1993.
- C – BELTON, et al., 1989.
- D – MATSUHIRO & RIVAS, 1993.
- E – TURQUOIS, T et al., 1996.

O uso de compostos anticoagulantes é muito comum na clínica médica. Anticoagulantes como heparina são bastante empregados, embora apresentem efeitos colaterais como trombocitopenia e hemorragias. Por outro lado, por ser de origem animal existe a possibilidade de conterem contaminantes, como príons (Rocha et al., 2005). Isto justifica a busca por novas drogas que não apresentem efeitos sem grandes prejuízos para a saúde do paciente.

Com o intuito de verificar uma provável atividade anticoagulante destes compostos foram feitos testes de APTT (tempo parcial de tromboplastina ativada) com o uso de “kits” comerciais (Labtest). Os resultados obtidos das frações da *Amansia multifida* e das algas comerciais estão resumidos na figura 4.



**Figura 4.** Avaliação da atividade anticoagulante das frações polissacarídicas das algas *Amansia multifida* (A) e carragenanas comerciais (B) na via intrínseca da cascata de coagulação (APTT).

A atividade anticoagulante dessas algas foi avaliada segundo o método APTT, como já descrito na metodologia, utilizando-se para isto plasma humano saudáveis. Com relação a *Amansia multifidas* os resultados mostram que apenas as frações F3 (150 µg/mL) e FT (200 µg/mL) apresentaram

atividade anticoagulante (240 s). No entanto, a FT requer uma concentração maior para apresentar o mesmo grau de atividade. Os três principais tipos de carragenanas industriais são as carragenanas comerciais lambda, kappa e iota. As duas últimas só apresentaram atividade anticoagulante (132,3 e 240 s, respectivamente) em uma concentração de 100 µg /mL, revelando uma atividade não encontrada nas frações da *A. multifida* a essa mesma concentração. A carragenana lambda apresentando maior atividade em relação as demais frações, com 240 s quando utilizou-se apenas 20 µg/mL.

## CONCLUSÕES

As frações da alga aqui estudadas são formadas basicamente de polissacarídeos sulfatados, com baixa contaminação protéica. Isso demonstra uma boa eficácia do método de extração. Algumas das frações evidenciaram atividade farmacológica mostrando-se ser um composto com potencialidades anticoagulante. Outros ensaios farmacológicos estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório com esta alga, a fim de se obter um maior conhecimento da utilidade farmacológica deste composto natural orgânico.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELTON, P. S.; GOODFELLOW, B. J.; WILSON, R. H. A Variable-Temperature Fourier Transform Infrared Study of Gelation in 1 – and K-Carrageenans. *Macromolecules*. v.22, p.1636–1642, 1989.
- CHOPIN, T.; WHALEN, E. A new rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. *Carbohydrate Research*. v.246, p.51-59, 1993.
- CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; GILARD, E.; HAKE, P.; SALZMAN, A. L.; SZABÓ, C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radical Biological Medicine*. v.24, p.450-459, 1998.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. *J Chromatogr.* v.130, p.299-304, 1977.
- DODGSON, K.S.; PRICE, R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* v.84, p.106-110, 1962.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. *Anal. Chem.* v.28, p.350-356, 1956.

- HENRIQUES, M. G. M. O. et al. Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz. J. Med. Res.* v. 20, p.243-249, 1987.
- LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. *Life Sci.* v.8, p.601-606, 1969.
- MATSUHIRO, B; RIVAS, P.; Second-derivative Fourier transform infrared spectra of seaweed galactans. *Journal of Applied Phycology.* v.5, p.45-51, 1993.
- MCCANDLESS, E.L. & CRAIGIE, J.S. A. *Rev. Plant Physiol.*v.30, p.41-53, 1979.
- RESS, D.A. *Carbohydr. Chem.* v.24. p.267-332, 1969.
- ROCHA, H. A. O. et al. Structural and Hemostatic Activities of a Sulfated Galactofucan from the Brown Alga *Spatoglossum schroederi*. *J. Biol. Chem.* v.280, p.41278-41288, 2005.
- SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br. J. Pharmacol.* v.118, p.829-838, 1996.
- SAMMONS, J. M. et al. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Research*, v.876, p.48-54, 2000.
- SCHIMIDT, C. 3,6-Anhydro-D-galactose as a constituent of kappa - carrageenin. *J. Amer. Chem. Soc.*, v.77, p.2837-2839, 1955.
- SEKKAL, M.; LEGRAND, P. A spectroscopic investigation of the carrageenans and agar in the 1500-100 cm<sup>-1</sup> spectral range. *Spectrochim. Acta.* v.49a, p.209-221, 1993.
- SPECTOR, J. Refinement of the coomassie blue method of protein quantification. A simple and linear spectrophotometric assay of 0.5 to 50µg of protein. *Anal. Biochem.* v. 86, p.142-143, 1978.
- TURQUOIS, T.; ACQUISTAPACE, S.; VERA, A. F.; WELTI, D. H. Composition of carrageenan blends inferred from <sup>13</sup>C-NMR and infrared spectroscopic analysis. *Carbohydrate Polymers.* v.31, p.273, 1996.
- VAN DE VALDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H. S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. *Carbohydrate Research.* v.339, p.2309-2313, 2004.

## INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE O TRANSPORTE DE MEDICAMENTOS POR MODAL RODOVIÁRIO

SONJA HELENA MADEIRA MACEDO<sup>1</sup>  
TATIANE RAMOS LÓPEZ GARCÍA<sup>2</sup>

1. Farmácia-Bioquímica, Mestre em Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Amazonas-UFAM.
2. Farmácia-Bioquímica, Mestre em Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos.

Autor responsável: S.H.M. Macedo E-mail: sonjahm@terra.com.br

### INTRODUÇÃO

As normas farmacêuticas referentes às Boas Práticas de Fabricação (*current Good Manufacturing Practices-cGMP*) surgiram nos Estados Unidos, no ano de 1978, por meio do seu órgão regulador a *Food and Drug Administration (FDA)*, com o intuito de controlar os possíveis desvios no processo de fabricação de produtos farmacêuticos, veterinários e biológicos. Em 2002, além das medidas de inovação tecnológica, foram criados rigorosos programas de reestruturação regulatória, no sentido de se conhecer e orientar o fabricante quanto aos principais riscos de desvios de qualidade, padronizar os controles, elaborar um sistema de qualidade integrado, estabelecer cooperação internacional e de proteção à saúde pública (FDA, 2004). Esses cuidados existem porque, em se tratando de medicamentos, o consumidor não consegue identificar a qualidade do produto que pode-

rá afetar sua saúde, sendo esta atribuição responsabilidade dos órgãos reguladores e do fabricante.

No Brasil, entre 1997 e 1998, o escândalo da falsificação de medicamentos e a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 1999, resultaram na elaboração de normas mais rigorosas no que diz respeito à fabricação, distribuição, transporte e comercialização de produtos farmacêuticos, dando origem a um novo processo na história brasileira no que tange à revisão e regulamentação das normas sanitárias.

As normas que regulamentam o Transporte de Medicamentos datam de 1976, porém somente a partir de 1998 é que houve a criação de novas e especificação de antigas normas que abrangem tanto os produtos termolábeis como os mantidos sob temperatura ambiente. Desde então, as empresas de transporte iniciaram a adequação regulatória de seus processos, no sentido de cumprir as