



Otimização do processo de extração dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas como ferramenta de processo biotecnológico

José Gerardo Carneiro^{1,2}, Ismael Nilo Lino de Queiroz², José Ednésio C. Freire², Manuela Araújo Carneiro³, Germana Conrado de Souza¹, Norma Maria Barros Benevides⁴

¹Professor do Instituto Federal do Ceará – IFCE. e-mail: gerardo@ifce.edu.br

²Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFC.

³Graduando de Odontologia – UFC.

⁴Professora do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFC.

Resumo: Polissacarídeos sulfatados são polímeros complexos e heterogêneos formados de unidades repetitivas e ricos em radicais sulfatados e têm sido descritos como moduladores de uma série de funções biológicas. A complexidade, a heterogeneidade e o rendimento dos polissacarídeos sulfatados variam quanto às espécies de algas, período e local de coleta e utilização de diferentes protocolos da extração influenciam no rendimento, nas propriedades físico-químicas e nas atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados. Neste estudo buscamos otimizar a extração dos polissacarídeos sulfatados, diminuindo o tempo e custo do processo de extração. A alga marinha *Caulerpa mexicana* foi coletada na praia de Flecheiras - Trairi - Ce, em agosto de 2011 e transportada ao laboratório CARBOLEC-DBBM-UFC, sendo lavada com água corrente e seca à sombra, depois triturada em moinho elétrico e armazenada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As extrações dos PS foram divididas em três grupos (A, B e C), realizadas de três maneiras diferentes, todas em triplicata. A extração (A) utilizando a metodologia segundo Farias *et al.* (2000) e outra duas (B e C) modificações destas. As duas modificações foram sobre o tempo de digestão enzimática, precipitação e os processos de limpeza e purificação. Os rendimentos foram de 1,46% no grupo (A); de 1,45% no grupo (B); de 1,7% no grupo (C), sendo aproximadamente 15% superior aos rendimentos do grupo A e B. Não foram observadas alterações nos teores de carboidratos totais, sulfato livre e proteínas contaminantes entre os grupos. Concluímos que o maior rendimento do grupo C se atribui ao fato de um maior tempo de precipitação e uma menor manipulação do material, evitando perdas nas lavagens e centrifugações.

Palavras-chave: Algas, Extração de polissacarídeos, Processos biotecnológicos

1. INTRODUÇÃO

As algas são organismos clorofilados, autotrófos, que não possuem tecidos especializados, nem vasos condutores. Composto por um grupo muito heterogêneo, variando entre pequenos organismos unicelulares, vivendo como uma célula ou agrupadas em colônias, até seres pluricelulares com muitas células, às vezes colaborando em conjunto, como tecidos simples, alguns com forma bastante complexa e diferenciada (LEE, 1997; BARSANTI; GUALTIERI, 2006; RAVEN *et al.*, 2007).

As macroalgas marinhas têm sido utilizadas ao longo do tempo para as mais variadas finalidades, tais como alimento, especialmente na China e no Japão; complemento nutricional, como fonte adicional de vitaminas e minerais; agentes terapêuticos para tratamento de muitas doenças, tais como a deficiência de iodo que pode levar ao bócio e hipertireoidismo; no tratamento de várias perturbações intestinais, como agentes hipoglicemiantes e na hipocolesterolemia, assim como em pomadas e curativos (EL GAMAL, 2010).

Nos últimos anos as empresas farmacêuticas começaram a olhar para organismos marinhos, incluindo algas, em sua busca por novas drogas a partir de produtos naturais. Estes produtos são também cada vez mais utilizados nas pesquisas médicas e bioquímicas (SMIT, 2004; MAYER, 2010; PATEL, 2012).

Polissacarídeos sulfatados (PS) são polímeros complexos e heterogêneos formados por unidades repetitivas de açúcares carregados negativamente devido à presença de radicais sulfatos, encontrados em grandes quantidades nas algas marinhas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; MATHEWS, 1975; AQUINO *et al.*, 2011). Os PS são os principais constituintes da matriz extracelular das algas marinhas, conferindo-lhes certa flexibilidade e estão presentes principalmente nas paredes celulares. A



ocorrência dos PS está relacionado com atividades fisiológicas importantes na manutenção e adaptação em ambientes estressantes, conferindo às algas funções de regulação iônica, mecânica e osmótica, além de agir como mecanismo de defesa das algas às respostas ambientais, favorecendo a sobrevivência desses organismos no ambiente marinho (ANDRADE *et al.*, 2010; AQUINO *et al.*, 2011).

Os PS de algas verdes do gênero *Caulerpa* tem sido relatados como moduladores de uma série de funções biológicas, como visto em estudos de atividades antitumoral (COSTA *et al.*, 2010; JI *et al.*, 2008), antiproliferativa (COSTA *et al.*, 2010), antiviral (GHOSH *et al.*, 2004), anticoagulante (RODRIGUES *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011), antitrombótica (RODRIGUES *et al.*, 2011), antioxidante (COSTA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011) antinociceptiva e antiinflamatória (RODRIGUES *et al.*, 2012).

A complexidade e a heterogeneidade, assim como o rendimento dos PS variam entre as diferentes espécies de algas e quando coletadas em diferentes períodos do ano e localidades e também sofrem influências das condições climáticas e ambientais (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; FRIEDLANDER; ZELIKOVITCH, 1984; FARIAS *et al.*, 2000; VASCONCELOS, *et al.*, 2011). Além desses fatores, a utilização de diferentes protocolos na extração de polissacarídeos, tais como o uso de solventes de precipitação e metodologias enzimáticas, influenciam no rendimento, nas propriedades físico-químicas e na atividade biológica dessas moléculas, podendo ser um fator determinante para suas aplicações nos diferentes setores econômicos (PERCIVAL; McDOWELL, 1967; CAMPO *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2009).

Neste estudo buscamos melhorar o processo de extração dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, procurando aumentar o rendimento e diminuir o tempo e custo no processo de extração, podendo ser uma ferramenta biotecnológica a ser utilizada no futuro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A alga marinha *Caulerpa mexicana* foi coletada na praia de Flecheiras no município de Trairi - CE, em agosto de 2011 durante a maré baixa (-0,1 a 0,3 m). Sendo acondicionada em sacos plásticos e transportada ao laboratório CARBOLEC-DBBM-UFC, em recipiente isotérmico, onde foram limpas, tendo as epífitas removidas, e lavadas com água corrente e depois estocadas a -20°C, para posterior utilização. Em um segundo momento as algas foram descongeladas, novamente lavadas com água corrente e secas à sombra, depois trituradas em moinho elétrico e armazenadas a temperatura ambiente, em recipiente plástico, tampado e ao abrigo da luz.

As extrações dos PS foram divididas em três grupos (A, B e C), realizadas de três maneiras diferentes, todas em triplicata. A extração (A) utilizando a metodologia segundo Farias *et al.* (2000), aqui denominado de protocolo padrão, e outras duas (B e C) modificações destas. As duas modificações foram sobre o tempo de digestão enzimática, precipitação e os processos de limpeza e purificação.

Na extração do grupo (A), colocou-se 5mg da alga triturada para hidratar em 250 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (Vetec Química, Rio de Janeiro, RJ) (pH 5,0) contendo EDTA 5 mM (Vetec Química, Rio de Janeiro, RJ) e cisteína 5 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Acrescentou-se 17 mL de uma solução de papaína bruta (Vetec Química, Rio de Janeiro, RJ) (30 mg mL⁻¹) e levou-se ao banho-maria (MARCONI, modelo MA 159) durante 6 horas a 60° C. Em seguida, o material foi filtrado e os polissacarídeos presentes na mistura foram precipitados por meio da adição de 16 mL de cloreto cetilpiridínio (CPC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 10% (2 h; 25° C). Logo após a precipitação, o extrato polissacarídico foi lavado (CPC 0,05%; 200 mL), (3 vezes), depois dissolvido em 174 mL de NaCl 2 M: etanol comercial (100: 15; v v⁻¹) e novamente precipitado através da adição de 200 mL de etanol comercial gelado (24 h; 4° C). Logo após a segunda precipitação, o material assim obtido foi lavado com 200 mL etanol comercial diluído a 80% (2 vezes), etanol comercial (200 mL; 1 vez), dialisado contra água destilada e liofilizado (LIOTOP, modelo L101).

O grupo (B) seguiu o protocolo padrão com modificações no tempo de digestão, sendo de 10 horas a 50° C. O grupo (C) seguiu o protocolo padrão com modificações no tempo de precipitação dos



carboidratos pelo CPC 10% (12 h; 25° C), na diminuição nos números de lavagem com CPC 5% (de 3 para 1) e no volume de álcool nas lavagens finais.

Em todas as extrações foram realizados a medição de carboidratos totais, sulfato livre e concentrações de proteínas contaminantes. Os teores de carboidratos totais foram determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956); de sulfato livre por hidrólise ácida (HCl 1 M, 5 horas, 105° C) por turbidimetria e lido em espectrofotômetro a 500 nm pelo método da gelatina-bário (DODGSON & PRICE, 1962); As concentrações de proteínas contaminantes foram realizadas segundo o método de Bradford (1976).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Várias metodologias vêm sendo desenvolvidas para a extração de polissacarídeos de algas marinhas, tais como aquosas, enzimáticas, básicas e ácidas; e a utilização de vários artifícios químicos e físicos para separação, fracionamento e purificação de seus carboidratos (AZEVEDO *et al.*, 2009; BILAN *et al.*, 2006; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007; FARIAS *et al.*, 2000; MACIEL *et al.*, 2008; PERCIVAL; McDOWELL, 1967; PUSHPAMALI *et al.*, 2008). A escolha da extração enzimática seguida da precipitação pelo CPC se deu por esse método garantir uma maior pureza de polissacarídeos sulfatados.

A extração dos PS seguiu o protocolo proposto por Farias *et al.*, (2000) com modificações tentando obter uma otimização do método de extração, buscando melhorar o rendimento de PS em um menor tempo e custo de extração.

No grupo (A) obteve-se um rendimento de 1,46%; no grupo (B) o rendimento foi de 1,45%, não diferindo significativamente do grupo (A); na extração do grupo (C) observou-se um rendimento de 1,7%, sendo aproximadamente 15% superior aos rendimentos do grupo A e B (Tabela 1).

O grupo (C) teve modificações no tempo de precipitação dos carboidratos pelo CPC 10% (de 2 h para 12 h, overnight), tornando maior o tempo de contato entre os carboidratos totais e o CPC aumentando a precipitação, e na diminuição nos números de lavagem com CPC 5% (de 3 para 1) e no volume de álcool nas lavagens finais os volumes foram adequados aos tubos da centrifuga (aprox. 180 ml/tubo),

Tabela 1 – Rendimentos e caracterização química de polissacarídeos sulfatados da alga verde *C. mexicana* pelo método de extração enzimática (A) proposto por Farias *et al.* (2000) e duas variações do mesmo (B e C).

	A	B	C
Rendimento (m)	72,4	73,1	85,1
Rendimento (%)	1,46	1,45	1,70
Carboidratos totais (%)	38,0	37,5	38
Proteínas (%)	ND	ND	ND
Sulfato Livre (%)	21,47	21,45	21,5

m – Média das triplicatas; ND – Não detectado.

Os dados encontrados estão dentro do esperado para o gênero *Caulerpa*. Segundo relatos encontrados na literatura, algas verdes têm apresentado rendimentos inferiores aos obtidos para algas vermelhas e pardas, estando de acordo com os estudos realizados por Rodrigues *et al.* (2011), onde mais recentemente, trabalhando com PS de algas marinhas verdes pertencentes ao mesmo gênero da alga em estudo apresentou um rendimento de 3,17% e 2,2% respectivamente, corroborando assim, com o fato de algas marinhas verdes apresentarem um baixo rendimento de PS totais.

Não houve variação significativa em relação as dosagem de carboidratos totais, teor de sulfato e presença de proteínas contaminantes entre os grupos A, B e C.



O maior rendimento do grupo C é atribuído ao fato de um maior tempo de precipitação e uma menor manipulação do material evitando perdas nas lavagens e centrifugações.

6. CONCLUSÕES

As modificações no tempo de contato dos carboidratos totais com o CPC 10% (de 2 h para 12 h, over night) aumentam a precipitação dos PS e a diminuição nos números de lavagem com CPC 5% (de 3 para 1) e no volume de álcool nas lavagens finais e adequação dos volumes aos tubos da centrífuga (aprox. 180 ml/tubo) diminuem a perda por manipulação e processamento.

Com essas modificações diminuiu-se o tempo de extração de 03 para 02 dias, bem como, a possibilidade de perdas, com conseqüente aumento do rendimento dos PS.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, L.R. *et al.*, Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. **Marine Pollution Bulletin**, v.60, n.9, p.1482-1488, 2010.

AQUINO, R. S. *et al.*, Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms. evolutionary implications. **Glycobiology**, v. 15, n. 1, p. 11-20, 2005.

AZEVEDO, T. C. G. *et al.*, Heparinoids algal and their anticoagulant hemorrhagic activities and platelet aggregation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v.63, n.7, p.477-483, 2009.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae – Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**. 1ª Ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2006.

BILAN, M. I. *et al.*, Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus*. **Carbohydrate Research**, Oxford, v.341, n.2, p.238-245, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMPO, V.L. *et al.*, Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.77. n.2, p.167-180, 2009.

CHATTOPADHYAY, K. *et al.*, Polysaccharides from *Caulerpa racemosa*: purificação and structural features. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.68, n.3, p.407-415, 2007.

COSTA, L. S. *et al.* Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21-28, 2010.

COSTA, M. S. S. P. *et al.* Evaluating the possible anticoagulant and antioxidant effects of sulfated polysaccharides from the tropical green alga *Caulerpa cupressoides* var. flabellate. **J. Appl. Phycol.** 2011.

DODGSON, K. S.; PRICE, R.G. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymatic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemistry Journal**, v. 78, p. 312-319, 1961.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.



- EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**. v. 18, p. 1–25, 2010.
- FARIAS, W.R.L. *et al.* Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.
- FRIEDLANDER, M.; ZELEKOVICH, N. Growth rates, phycocolloid yield and quality of the red seaweeds, *Gracilaria* sp, *Pterocladia capillacea*, *Hypnea musciformis*, and *Hypnea cornuta*, in field studies in Israel. **Aquaculture**, Amsterdam, v.40, n.1, p.57-66, 1984.
- GHOSH, P. *et al.* In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3151-3157, 2004.
- Jl, H. *et al.* Separation of the Polysaccharides in *Caulerpa racemosa* and their chemical composition and antitumor activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, p. 1435–1440, 2008.
- LEE, R.E. **Phycology**. 2 ed. Cambridge University Press, New York, NY 10011-4211, USA, 1997.
- MACIEL, J.S. *et al.*, Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharides from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.71, n.4, p.559-565, 2008.
- MATHEWS, M.B. **Polyanionic proteoglycans**. In: Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution Kleinzeller, Springer, G.F.; Witman, H.G. (eds). Berlin: Springer-Verlaq, p.93-125, 1975.
- MAYER, A. M. S.; LEHMANN, V. K. B. Marine pharmacology in 1998: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, antiinflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; with actions on the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems; and other miscellaneous mechanisms of action. **Pharmacologist**. v.42, p.62–69. 2000.
- PATEL, S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. **Biotech**. 2012.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R.H. **Chemistry and enzymology of merine algal polysaccharides**. New York: Academic Press, 219, 1967.
- PUSHPAMALI, W. A. *et al.*, Isolation and purification of an anticoagulant from fermented red seaweed *Lomentaria catenata*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.73, n.2, p.274-279, 2008.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- RODRIGUES, J.A.G. *et al.*, Análise de metodologias na precipitação de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v.4, n.1, p.32-43, 2009.
- RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, fracionamento e atividade anticoagulante. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 2, p. 113-120, 2010.



RODRIGUES, J. A. G. *et al.* An antithrombin-dependent sulfated polysaccharide isolated from the green alga *Caulerpa cupressoides* has *in vivo* anti- and prothrombotic effects. **Ciência Rural**, v.41, n.4, 2011.

RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the marine green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 282-292, 2012.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**. v.16, p.245–262, 2004.

VASCOCELOS, M. A. *et al.*, Temporal variation in vegetative development of *caulerpa scalpelliformis* (chlorophyta) from baleia beach, Ilha Grande bay (Rio de Janeiro, Brazil). **Brazilian Journal of Oceanography**. v. 59, p. 145-152, 2011.