



Glicosaminoglicanos isolados da pele de palombeta (*Chloroscombrus chrysurus*) e guaiúba (*Ocyurus chrysurus*): características e implicações biológicas

José Ariévil Gurgel Rodrigues¹, Edfranck de Sousa Oliveira Vanderlei², Ana Luíza Gomes Quinderé², Bruno Pedrosa Fontes², Ismael Nilo Lino de Queiroz² e Norma Maria Barros Benevides^{3*}

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Fortaleza, Ceará, Brasil. ²Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. ³Laboratório de Carboidratos e Lectinas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, s/n, 60455-970, Fortaleza, Ceará, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: nmbb@ufc.br

RESUMO. O Brasil abriga uma das maiores biodiversidades marinhas do mundo, favorecendo a descoberta de fontes alternativas de compostos farmacológicos. Desta forma, objetivou-se avaliar o potencial anticoagulante de glicosaminoglicanos (GAGs) isolados das peles da palombeta (*Chloroscombrus chrysurus*) e guaiúba (*Ocyurus chrysurus*). Os GAGs foram extraídos com papaína bruta em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM, seguido por cromatografia de troca iônica do extrato total em coluna de DEAE-celulose. As frações obtidas foram analisadas quanto à composição química (proteínas contaminantes e carboidratos totais) e os GAGs identificados por eletroforese em gel de agarose a 0,5%. Os ensaios de atividade anticoagulante foram realizados por meio do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) usando plasma humano normal e heparina-padrão (193,00 UI mg⁻¹). O procedimento de obtenção e fracionamento dos GAGs mostrou-se eficiente, indicando semelhantes perfis cromatográficos entre as espécies avaliadas e, revelando para *C. chrysurus*, bandas com mobilidades semelhantes ao dermatam sulfato e com atividade de apenas 3,30 UI mg⁻¹.

Palavras-chave: teleosteos marinhos, glicosaminoglicanos sulfatados, coagulação sanguínea, teste do TTPA.

Glycosaminoglycans isolated from the skin of 'palombeta' (*Chloroscombrus chrysurus*) and 'guaiúba' (*Ocyurus chrysurus*): features and biological implications

ABSTRACT. A great number of pharmacological compounds is found in the Brazilian marine diversity. This study evaluated the anticoagulant potential of glycosaminoglycans (GAGs) isolated from the skin of 'palombeta' *Chloroscombrus chrysurus* and 'guaiúba' *Ocyurus chrysurus*. GAGs were extracted with crude papain in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 5 mM cysteine and 5 mM EDTA, followed by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose column. The chemical composition (contaminant proteins and total carbohydrates) and the analysis by 0.5% agarose gel electrophoresis of fractions were also determined. Anticoagulant assays were performed by activated partial thromboplastin time (APTT) using normal human plasma and standard heparin (193.00 IU mg⁻¹). The obtaining and fractionation procedures of GAGs were effective and similar chromatographic profiles were verified between the species. A similar mobility to dermatan sulfate was revealed for *C. chrysurus*. This GAG also showed a low activity of 3.30 IU mg⁻¹.

Keywords: marine teleosts, sulfated glycosaminoglycans, blood coagulation, APTT test.

Introdução

A biodiversidade marinha brasileira abrange uma linha de costa de aproximadamente 9.198 km, a qual se encontra banhada por águas quentes e frias das bordas tropicais e subtropicais do Atlântico Sul Ocidental. Tal diversidade se faz presente em uma grande variedade de ambientes aquáticos. Os peixes, em especial, representam um grupo heterogêneo de organismos aquáticos em diversidade morfológica e ciclos de vida, embora exibam uma sequência evolutiva contínua. Os peixes teleosteos, por exemplo, são considerados o

grupo mais evoluído em termos anatômicos, de comportamento e ecologia, ocupando diferentes níveis tróficos (pelágico, demersal, bentônico etc.) e respondendo às variações do ambiente quanto à sua necessidade de migrar-se por alimento e reprodução (PAES, 2002).

A grande diversidade biológica favorece a descoberta de fontes alternativas de compostos bioativos para a biotecnologia. Dentre eles, os polissacarídeos sulfatados (PSs), os quais são naturalmente encontrados, por exemplo, nas algas marinhas (ANANTHI et al., 2010; FONSECA

et al., 2008; HAYAKAWA et al., 2003; PEREIRA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2009a, 2010), invertebrados (CARDILO-REIS et al., 2006; BORSIG et al., 2007; FONSECA et al., 2009), vertebrados (MANSOUR et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009b; SOUZA et al., 2007a; TINGHO et al., 2005) e gramíneas marinhas (AQUINO et al., 2005). Nos vertebrados, esses compostos são conhecidos como glicosaminoglicanos (GAGs), heteropolissacarídeos aniônicos, complexos e lineares constituídos por unidades dissacarídicas repetidas de uma hexosamina e outro açúcar não-aminado, destacando-se o dermatam sulfato (DS), queratam sulfato, heparam sulfato (HS), condroitim sulfato (CS) e heparina (HEP). Encontrados em todos os filós de organização tissular (MEDEIROS et al., 2000), esses compostos apresentam atividades biológicas de grande interesse nas ciências médicas (BORSIG et al., 2007; DELLIAS et al., 2004; FONSECA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009b; 2011; SOUZA et al., 2007a).

A busca por novos anticoagulantes é justificada pelo aumento do número de pessoas acometidas por doenças cardiovasculares no mundo e ao uso terapêutico da HEP e suas complicações na clínica médica (NADER et al., 2001; MELO et al., 2008). Adicionalmente, restritos ainda são os estudos farmacológicos de GAGs extraídos de peixes e o DS tem sido o GAG mais encontrado em vertebrados marinhos. DS isolados de peles de raias da costa brasileira *Dasyatis americana* e *D. guttata* (DELLIAS et al., 2004) e do tubarão azul *Prionace glauca* (NANDINI et al., 2005) apresentaram atividade anticoagulante. Para um agente anticoagulante e antitrombótico, Souza et al. (2007a) reportaram do DS isolado da pele da enguia elétrica *Electrophorus electricus*, habitante do rio Amazonas.

A guaiúba (*Ocyurus chrysurus*, Bloch, 1791) (Peciformis; Lutjanidae) é um peixe com ampla distribuição geográfica, encontrado do Atlântico Ocidental desde Nova Inglaterra (EUA) ao Sudeste do Brasil, enquanto a espécie conhecida como palombeta (*Chloroscombrus chrysurus*, Linnaeus, 1766) (Peciformis; Carangidae) pode ser frequentemente encontrada em estuários (CERVIGÓN et al., 1992). Neste contexto, o presente estudo se propôs a contribuir com informações adicionais quanto à identificação de novos GAGs presentes em vertebrados marinhos e avaliar o potencial desses compostos como agentes anticoagulantes.

Material e métodos

Remoção da pele do músculo

Dois exemplares adultos de palombeta (peso = 142,00 g; comprimento = 25,75 cm) e um de guaiúba

(peso = 327,00 g; comprimento = 39,70 cm) foram adquiridos de estabelecimentos comerciais de Fortaleza, Estado do Ceará. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará. A remoção e tratamento da pele do músculo dos peixes foram realizadas segundo Rodrigues et al. (2009b e 2011). Após desidratada ao sol, a pele foi armazenada em frasco fechado para posterior extração dos GAGs.

Extração dos GAGs

Os GAGs foram obtidos pela combinação de duas metodologias propostas por Rodrigues et al. (2009b). Brevemente, a pele foi hidratada com 80 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (AcNa) (Vetec Química) (pH 5,0) contendo cisteína 5 mM (Sigma Chemical) e EDTA 5 mM (QEEL). Em seguida, foram adicionados 30% de papaína bruta (Vetec Química), sendo a mistura incubada em banho-maria (MARCONI, modelo MA 159) a 60°C por 24h. Após incubação, o material foi filtrado, centrifugado (8.000 × g; 4°C; 30 min.) e, ao sobrenadante, adicionados 3,5 mL de uma solução de cloreto cetilpiridínio (CCP) (Sigma Chemical) a 10% para precipitação dos GAGs (25°C; 72h). O precipitado foi lavado com 200 mL de CCP 0,05%, dissolvido em 100 mL de NaCl 2 M: etanol comercial (100: 15; v v⁻¹) e submetido a uma nova precipitação pela adição de 80 mL de etanol comercial (4°C; 24h). Logo após a precipitação, o material foi centrifugado, submetido a duas lavagens com 100 mL de etanol comercial a 80% e outra lavagem com etanol comercial concentrado (100 mL), sendo finalmente seco em estufa com circulação de ar (MARCONI, modelo MA 035) a 40°C por 3h.

Cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose)

O extrato total foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose (12 × 1,5 cm) (Sigma Chemical) percolada com o tampão AcNa 0,05 M (pH 5,0) até a completa remoção dos polissacarídeos não-retidos, seguido do fracionamento dos GAGs por eluição com o mesmo tampão de equilíbrio contendo NaCl em diferentes concentrações (0,50; 0,75 e 1,00 M). As frações obtidas foram monitoradas por meio da propriedade metacromática usando o azul 1,9-dimetilmetileno (ADM) (Sigma-Aldrich), segundo Farndale et al. (1986) em leitor de Elisa AMERSHAM BIOSCIENCES, modelo BIOTRAK II a 492 nm. Em seguida, as frações metacromáticas foram dialisadas e concentradas por liofilização para os ensaios posteriores.

Identificação dos GAGs por eletroforese

Os GAGs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,5% (Bioagency) utilizando padrões de GAGs conhecidos: condroitim 4-sulfato (CS) de cartilagem de baleia, dermatam sulfato (DS) de pele de porco e heparam sulfato (HS) de pulmão de bovino.

As frações de GAGs (25 µg) foram aplicadas no gel preparado em tampão 1,3-acetato diaminopropano 0,05 M (Aldrich) (pH 5,0). A corrida foi realizada utilizando-se voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após a corrida, os GAGs presentes no gel foram fixados com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio 0,1% (Vetec Química) por 24h. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% (Vetec Química) e descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v:v:v), segundo Dietrich e Dietrich (1976).

Análises químicas dos GAGs

A presença e o teor de carboidratos totais (CT) das frações de GAGs foram determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) em placa (MASUKO et al., 2005), utilizando a D-galactose para a obtenção da curva-padrão em leitor de ELISA (AMERSHAM BIOSCIENCES, modelo BIOTRAK II) ajustado a 492 nm. O conteúdo de proteínas contaminantes (PC) foi estimado pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

Teste anticoagulante *in vitro*

A avaliação dos efeitos dos GAGs sobre o tempo normal de coagulação foi realizada por meio do teste do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), segundo especificações do fabricante. Inicialmente, sangue de humano normal citratado (diferentes doadores) foi centrifugado (73,75 × g; 15 min.) para a obtenção de um plasma pobre em plaquetas. Para a realização do teste, 50 µL de plasma humano foram incubados a 37°C por 3 min. com 10 µL da amostra de GAG e 50 µL do reagente TTPA (CLOT, Bios diagnóstica). Após a incubação, foram adicionados 50 µL de cloreto de cálcio 25 mM (CLOT, Bios diagnóstica) à mistura para ativar a cascata de coagulação. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo o tempo de coagulação registrado automaticamente em coagulômetro (DRAKE, modelo QUICK-TIMER) e a atividade expressa em unidades internacionais por mg de polissacarídeo utilizando a heparina com 193 UI mg⁻¹, como curva-padrão. Analisou-se a atividade dos GAGs por meio

de ANOVA seguido pelo teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ como significante.

Resultados e discussão

PSs extraídos de algas (macro e microalgas) têm sido relatados como promissores substitutos para HEP (HAYAKAWA et al., 2003; PEREIRA et al., 2005; FONSECA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009a, 2010), porém pouco ainda se sabe sobre os GAGs isolados de animais, especialmente dos presentes em peixes (DELLIAS et al., 2004; MANSOUR et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009b; 2011; SOUZA et al., 2007b). A investigação desses últimos também poderá ajudar a compreender melhor a hipótese de seu papel biológico na imunidade inata desse grupo de vertebrados (RODRIGUES et al., 2011), tendo em vista o crescimento da piscicultura no mundo, o que exige, como em qualquer sistema intensivo de cultivo (WATANABE et al., 2002), o controle sanitário da produção mediante o monitoramento de doenças (KUBITZA; KUBITZA, 1999).

Extração e fracionamentos dos GAGs

O emprego da digestão enzimática de proteínas por enzimas proteolíticas (papaína) na extração e assim como de CCP na concentração por precipitação de GAGs, seguido do fracionamento do extrato total por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose demonstrou-se eficiente. Os perfis cromatográficos indicaram semelhanças marcantes entre as espécies analisadas (Figura 1). As frações F I e F II obtidas para as duas espécies mostraram que *C. chrysurus* (Figura 1A) é mais rica em GAGs quando comparada a *O. chryurus* (Figura 1B). Entretanto, a maior quantidade de CT observada na F II de *O. chryurus* sugere que polissacarídeos acídicos sejam predominantes nessa espécie, como já reportado para outros teleosteos (PFEILER, 1998) e algas marinhas (ANANTHI et al., 2010; HAYAKAWA et al., 2000).

Os polissacarídeos são macromoléculas mais abundantes nos organismos vivos, garantindo proteção, suporte, forma, rigidez e elasticidade aos tecidos animais e vegetais. Os GAGs são constituintes naturais da matriz extracelular em todos os organismos que apresentam organização tecidual (DIETRICH; DIETRICH, 1976; MEDEIROS et al., 2000; TINGHO et al., 2005), sendo detectados no líquido sinovial, cartilagens e pele. As funções desses compostos estão relacionadas com a resistência a infecções, controle de água e eletrólitos, cicatrização (KUBITZA; KUBITZA, 1999), adesão e reconhecimento celular (MEDEIROS et al., 2000),

atividade anticoagulante (DELIAS et al., 2004; MANSOUR et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009b; 2011), funções biológicas em diferentes órgãos elétricos (SOUZA et al., 2007b), dentre outras.

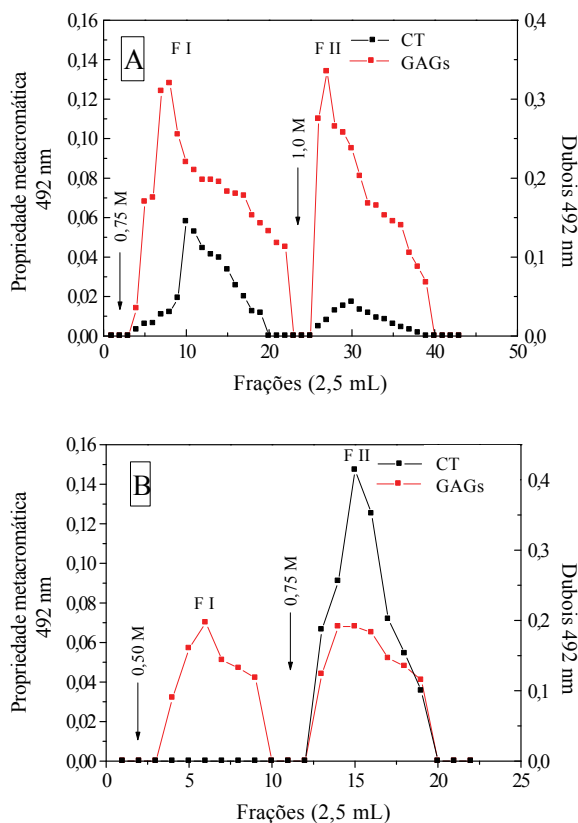


Figura 1. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose dos extratos totais de GAGs da pele da palombeta (*Chloroscombrus chrysurus*) (A) e guaiúba (*Ocyurus chrysurus*) (B). A coluna foi equilibrada com tampão AcNa 0,05 M. Os GAGs adsorvidos no gel foram eluídos com o tampão AcNa contendo NaCl em diferentes concentrações (0,50; 0,75 e 1,00 M). (■-■) metacromasia (GAGs); (■-■) carboidratos totais (CT).

Nos peixes, o muco promove defesa contra organismos patogênicos pela sua ação neutralizante, bactericida e fungicida, sendo sua produção regulada por mecanismos hormonais, a qual vem a aumentar durante a infestação por parasitas ou exposição dos peixes a águas com pH ácido (< 5,5) ou alcalino (> 10). Desta forma, uma nutrição balanceada é requisito básico para a produção normal de muco nos peixes durante eventos que promovam estresse (despescas, transporte, reprodução etc), enquanto o inadequado manejo terapêutico com produtos químicos (antibióticos e formalina) e aqueles de ações oxidativa (permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio e cloro), podem resultar na destruição da camada protetora de muco, favorecendo a ação de parasitas e patógenos nos animais (KUBITZA; KUBITZA, 1999).

Neste estudo, a eficiência no fracionamento dessas macromoléculas extraídas das peles denota uma presença variável de GAGs entre as espécies (Figura 1). A detecção dessas moléculas por análise bioquímica, a partir da obtenção de perfis cromatográficos, sugere a hipótese de relacionar características com aplicações na identificação de unidades de estoque de populações de peixes em estudos de biologia pesqueira (RODRIGUES et al., 2009b), tendo em vista que populações diferentes devem apresentar parâmetros biológicos diferentes. Segundo Medeiros et al. (2000), a ocorrência dos GAGs em todo o reino animal sugere que eles se conservaram ao longo do processo evolutivo.

A detecção dessas biomoléculas poderia vir a contribuir para melhor compreensão dos mecanismos de defesa inata em peixes, tendo em vista o crescimento da piscicultura marinha no mundo. Neste contexto, a estratégia de análise de GAGs também sugere como uma ferramenta de avaliação e monitoramento do estado de saúde e resistência em peixes, favorecendo o desenvolvimento de estratégias de manejo profilático mais eficientes aos diversos problemas relacionados com a aquicultura intensiva (RODRIGUES et al., 2011).

Caracterização dos GAGs por eletroforese

A eletroforese em gel de agarose revelou bandas de GAGs homogêneas, quando eluídas com 0,75 e 1,00 M de sal, denotando a eficiência da coluna DEAE-celulose na purificação desses compostos isolados de *C. chrysurus* (Figura 2). Essas frações, quando comparadas aos padrões de GAGs, apresentaram um perfil eletroforético semelhante à mobilidade de corrida do DS, sugerindo assim a ocorrência preliminar única desse GAG na pele do animal (RODRIGUES et al., 2011). Na avaliação da composição química em CT para a referida espécie, as frações de GAGs (F I e F II) apresentaram, respectivamente, 50,20 e 33,60%, enquanto PC mostraram-se ausentes, sugerindo a eficiência do método utilizado (papaína) no processo de extração desses compostos (RODRIGUES et al., 2010; 2011). As frações de GAGs de *O. chrysurus* não foram reunidas pela escassez de material para análise (Figura 1B).

A papaína tem sido bastante utilizada no processo de extração de PSs oriundos de tecidos de diferentes origens (AQUINO et al., 2005; MANSOUR et al., 2009; PEREIRA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2009a; 2010; 2011). Por exemplo, a obtenção de DS e CS extraídos das peles das espécies de raias marinhas, *Dasyatis americana*, *D. guttata*, e *Aetobatus narinari*, e da espécie de raia de água doce

Potamotrygon motoro (DELLIAS et al., 2004); DS; CS e HS do tecido muscular do bacalhau *Gadus morhua* e peixe lobo *Anarhichas minor* (TINGHO et al., 2005), DS da pele da enguia elétrica *Electrophorus electricus*, nativa do rio Amazonas (SOUZA et al., 2007a) e a identificação preliminar da presença preponderante de HS presente na pele da carpa comum, *Cyprinus carpio* (RODRIGUES et al., 2009b), e de DS na pela da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, por Rodrigues et al. (2011).

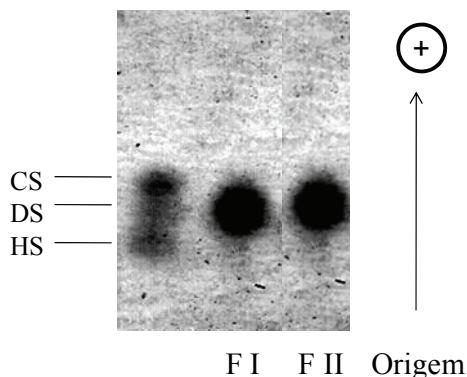


Figura 2. Revelação das frações de GAGs obtidas por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) da palombeta (*Chloroscombrus chrysurus*) por eletroforese em gel de agarose. As frações (F I e F II) e os padrões de condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS) foram corados com azul de toluidina a 0,1%.

Também tem sido reportado a ocorrência de GAGs em diferentes órgãos de peixes. GAGs da enguia elétrica, *E. electricus*, ocorrem na forma de CS como polissacarídeo principal, acompanhado de baixas concentrações de cadeias de híbridos CS/DS e HS. A detecção desses GAGs em diferentes órgãos elétricos dessa espécie poderia estar relacionada à distribuição e localização do CS na função biológica (SOUZA et al., 2007b).

Atividade anticoagulante

O teste do TTPA indicou diferenças marcantes entre as frações de GAGs das espécies avaliadas (Tabela 1). As frações de *C. chrysurus* modificaram o tempo normal de coagulação, quando prolongamentos de 1,22 e 1,18 vezes foram observados a partir de alíquotas (10 µL) das frações F I e F II, respectivamente, expressa pela relação $T_1 T_0^{-1}$. Entretanto, quando as mesmas frações foram liofilizadas, apresentaram baixo potencial anticoagulante, a uma elevada concentração de polissacarídeo (1,00 mg mL⁻¹), cujas atividades foram de apenas 2,67 (F I) e 3,30 (F II) UI mg⁻¹, respectivamente, quando comparadas à HEP não-fractionada. As frações de GAGs de *O. chrysurus*, por

sua vez, não foram capazes de prolongar o TTPA expresso pela relação $T_1 T_0^{-1}$.

Tabela 1. Atividade anticoagulante *in vitro* das frações de GAGs obtidas por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) de *Chloroscombrus chrysurus*.

Fração	NaCl	Atividade			
		* $T_1 T_0^{-1}$	**mg mL ⁻¹	***TTPA (s)	****UI mg ⁻¹
F I	0,75 M	1,22	1,00	56,95	2,67 ^a
F II	1,00 M	1,18	1,00	68,80	3,30 ^a
HEP	Não-fractionada	-	0,01	40,15	193,00 ^b
Plasma	-	1,00	-	38,70	-

*Atividade expressa pela relação de prolongamento $T_1 T_0^{-1}$ pelo TTPA; **Concentração de GAG (DS) para prolongar minimamente o TTPA; ***TTPA em segundos; **** Unidades internacionais por mg de polissacarídeo (resultados da média de três determinações). Letras iguais significam ausência de diferença estatística em nível de 5%.

Restritos têm sido os estudos de atividades biológicas de GAGs isolados de peixes. O DS isolado da pele ventral da raia habitante da costa cearense *D. americana* apresentou potente atividade anticoagulante (TTPA) mediante à ação potencializada do inibidor plasmático cofator II da heparina sobre a trombina (DELLIAS et al., 2004), este último um dos reguladores plasmáticos da coagulação sanguínea. Uma atividade anticoagulante (DS) foi relatada para a enguia elétrica brasileira de água doce (*E. electricus*), tendo como mediador inibitório o cofator II da heparina sobre a trombina. Esse GAG também apresentou efeito antitrombótico (dose-dependente), reduzindo a formação de trombos em até 50% em ratos (SOUZA et al., 2007a). Quando os pesquisadores compararam a outra espécie de enguia (*Anguilla japonica*) (SAKAI et al., 2003), foi observado que o DS isolado desta última não apresentou atividade anticoagulante, mesmo apresentando uma composição dissacarídica semelhante à espécie brasileira. Recentemente, um GAG isolado da pele da carpa comum, *C. carpio*, apresentou atividade anticoagulante (4,89 UI), também utilizando desta metodologia (RODRIGUES et al., 2009b), e um DS anticoagulante isolado da pele da raia asiática *Raja radula* foi reportado por Mansour et al. (2009).

Neste trabalho, o procedimento utilizado para a obtenção de GAGs com atividade anticoagulante de peixes marinhos também mostrou-se eficiente, em que a espécie *C. chrysurus* apresentou efeitos anticoagulantes, porém ausentes na *O. chrysurus* (Tabela 1). Possivelmente, a atividade de captura desta última venha a favorecer a uma diminuição das defesas imunológicas naturais, ocasionando perda da camada protetora de muco (KUBITZA; KUBITZA, 1999), o que, de certa forma, vem a justificar a ausência da atividade na espécie *O. chrysurus*, teleosteo que habita regiões próximas ao substrato (peixe demersal). Portanto, a realização de estudos comparativos com outras espécies selvagens de peixes

participantes da pesca comercial se faz necessário, contribuindo assim para o papel biológico dos GAGs na imunidade inata desses organismos e reforçando tais observações encontradas nesta pesquisa.

A busca por novos heparinoides também tem se expandido a uma grande variedade de organismos aquáticos. Um PS do tipo HEP isolado da ascídia *Styela plicata* (Chordata-Tunicata) com efeitos antitrombóticos e baixo risco de sangramento foi estudado por Cardilo-Reis et al. (2006), quando em modelos de trombose venosa e perda sanguínea utilizando ratos. Os autores constataram que na dose de 5 mg kg⁻¹ do composto administrado intravenosamente produziu efeito sobre o TTPA (1,8 vezes) e inibindo a trombose venosa em ratos (45 ± 13.5%), sem desencadear efeito hemorrágico significativo. Segundo Fonseca et al. (2009), polissacarídeos ricos em unidades de fucose 2,4-disulfatada exerceram efeitos sobre a coagulação e trombose, porém com grande potencial hemorrágico em ratos, do pepino do mar *Ludwigothurea grisea*.

Wu et al. (2011) produziram diferentes fragmentos de baixos pesos moleculares de um PS do tipo condroitim sulfato fucosilado do pepino do mar *Thelenata ananas* e observaram decréscimos acentuados de seus efeitos sobre o TTPA. Segundo os pesquisadores, para se alcançar um efeito anticoagulante significativo seria requerido pelo menos uma cadeia de oligossacarídeos de aproximadamente de seis a oito unidades de açúcares (6000-7000 Da). Esse requerimento químico também se mostrou importante para desencadear inibição da atividade da trombina e que experimentos complementares seriam fundamentais para averiguar seus efeitos antitrombóticos em modelos animais *in vivo*.

Estudos comparativos entre diferentes polissacarídeos oriundos de animais e algas marinhas têm sido considerados uma estratégia importante, tendo em vista a complexidade e heterogeneidade, principalmente, daqueles encontrados nas algas marinhas (FONSECA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010). Esses estudos têm como objetivo relacionar características na melhor compreensão das variações estruturais desses compostos entre os diferentes organismos, bem como avaliar seus efeitos em diferentes modelos experimentais de trombose com animais, elucidando mecanismos de ação.

Em suma, o isolamento de polissacarídeos de peixes também pode ser uma ferramenta promissora para diferentes propósitos de investigação. A atividade pesqueira também proporciona a geração de resíduos do processamento de pescado, onde são, na grande maioria das vezes, descartados pela falta de um uso adequado. A avaliação do potencial farmacológico

desses compostos isolados das diferentes espécies de peixes existentes na biodiversidade marinha brasileira e participantes da pesca comercial poderia resultar em alternativa futura de utilização.

Conclusão

O emprego da papaína para a extração de glicosaminoglicanos da pele de palombeta (*Chloroscombrus chrysurus*) e guaiúba (*Ocyurus chrysurus*) mostra-se eficiente. A análise por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) resulta na separação de duas frações que revela, por eletroforese, a ocorrência preliminar de dermatam sulfato em *C. chrysurus*, exceção em *O. chrysurus*, a qual não teve seus glicosaminoglicanos físico-quimicamente caracterizados pela escassez de material para análise. Os compostos de *C. chrysurus* modificaram a coagulação sanguínea *in vitro*, mas com efeitos anticoagulantes inferiores à da heparina, porém os dos presentes na espécie *O. chrysurus* não alteraram a coagulação.

Diante desses achados, sugere-se que o estudo entre as características bioquímicas de glicosaminoglicanos extraídos de palombeta (*C. chrysurus*) e guaiúba (*O. chrysurus*) releva como uma ferramenta auxiliar em investigações que objetivem a biologia de espécies de peixes teleosteos marinhos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Renorbio, à Funcap, ao CNPq, à CAPES, ao MCT e ao MS.

Referências

- ANANTHI, S.; RAGHAVENDRAN, R. B.; SUNIL, A. G.; GAYATHRI, V.; RAMAKRISHNAN, G.; VASANTHI, H. R. *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 187-192, 2010.
- AQUINO, R. S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A. M.; VALENTE, A. P.; ANDRADE, L. R.; MOURÃO, P. A. S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, v. 15, n. 1, p. 11-20, 2005.
- BORSIG, L.; WANG, L.; CAVALCANTE, M. C. M.; CARDILO-REIS, L.; FERREIRA, P. L.; MOURÃO, P. A. S.; ESKO, J. D.; PAVÃO, M. S. G. Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea Cucumber. Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 20, p. 14984-14991, 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

- CARDILO-REIS, L.; CAVALCANTE, M. C. M.; SILVEIRA, C. B. M.; PAVÃO, M. S. G. *In vivo* antithrombotic properties of a heparin from the oocyte test cells of the sea squit *Styela plicata* (Chordata-Tunicata). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 11, p. 1409-1415, 2006.
- CERVIGÓN, F.; CIPRIANI, R.; FISCHER, W.; GARIBALDI, L.; HENDRICKX, M.; LEMUS, A. J.; MÁRQUEZ, R.; POUTIERS, J. M.; ROBAINAB, G.; RODRIGUEZ, B. **Fichas FAO de identificación de especies para los fines de la pesca**. Guía de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de La costa septentrional de sur América. Rome: FAO, 1992. (Preparado com El financiamiento de La comisión de Comunidades Europeas y de NORAD).
- DELLIAS, J. M. M.; ONOFRE, G. R.; WERNECK, C. C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A. M.; MELO, F. R.; FARIAS, W. R. L.; SILVA, L. C. F. Structural composition and differential anticoagulant activities of dermatan sulfates from the skin of four species of rays, *Dasyatis americana*, *Dasyatis guttata*, *Aetobatus narinari* and *Potamotrygon motoro*. **Biochimie**, v. 86, n. 9-10, p. 677-683, 2004.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.
- 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, n. 3, p. 350-356, 1956.
- FARNDALE, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochemistry et Biophysica Acta**, v. 883, n. 2, p. 173-177, 1986.
- FONSECA, R. J. C.; SANTOS, G. R. C.; MOURÃO, P. A. S. Effects of polysaccharides enriched in 2,4-disulfated fucose units on coagulation, thrombosis and bleeding. Practical and conceptual implications. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, n. 2, p. 829-836, 2009.
- FONSECA, R. J. C.; OLIVEIRA, S. N. M. C. G.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MOURÃO, P. A. S. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 3, p. 539-545, 2008.
- HAYAKAWA, Y.; HIRASHIMA, Y.; YAMAMOTO, H.; KURIMOTO, M.; HAYASHI, T.; LEE, J. B.; ENDO, S. Mechanism of activation of heparin cofactor II by calcium spirulan. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 416, n. 1, p. 47-52, 2003.
- HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J. B.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAWA, N. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1543, n. 1, p. 86-94, 2000.
- KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. Jundiaí: F. Kubitz, 1999.
- MANSOUR, M. B.; MAJDOUB, H.; BATAILLE, I.; ROUDESLLI, M. S.; HASSINE, M.; AJZENBERG, N.; CHAUBET, F.; MAAROUFI, R. M. Polysaccharides from the skin of the ray *Raja radula*. Partial characterization and anticoagulant activity. **Thrombosis Research**, v. 123, n. 4, p. 671-678, 2009.
- MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S. I.; LEE, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69-72, 2005.
- MEDEIROS, G. F.; MENDES, A.; CASTRO, R. A. B.; 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. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1475, n. 3, p. 285-294, 2000.
- MELO, E. I.; PEREIRA, M. S.; CUNHA, R. S.; SÁ, M. P. L.; MOURÃO, P. A. S. Heparin quality control in the Brazilian market: implications in the cardiovascular surgery. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 23, n. 2, p. 169-174, 2008.
- NADER, H. B.; PINHAL, M. A. S.; BAÚ, E. C.; CASTRO, R. A. B.; MEDEIROS, G. F.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L.; TRINDADE, E. S.; SHINJO, S. K.; ROCHA, H. A. O.; TERSARIOL, I. L. S.; MENDES, A.; DIETRICH, C. P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interactions with vascular endothelial cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 6, p. 699-709, 2001.
- NANDINI, C. D.; ITOH, N.; SUGAHARA, K. Novel 70-kDa chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains with a unique heterogeneous sulfation pattern from shark skin, which exhibit neuritogenic activity and binding activities for growth factors and neurotrophic factors. **Journal of Biology Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4058-4069, 2005.
- PAES, E. T. Nécton marinho. In: PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. (Ed.). **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p. 159-193.
- PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MELO, M. R. S.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 12, p. 2015-2023, 2005.
- PFEILER, E. Acidic glycosaminoglycans in marine teleost larvae: evidence for a relationship between composition and negative charge density in *Elopomorph leptoccephali*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119, n. 1, p. 137-144, 1998.
- RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 2, p. 224-231, 2009a.
- RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUEIROZ, I. N. L.; QUINDERÉ, A. L. G.;

- BENEVIDES, N. M. B. Purificação e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados da pele da carpa comum, *Cyprinus carpio*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 3, p. 381-387, 2009b.
- RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; BENEVIDES, N. M. B. 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.; QUINDERÉ, A. L. G.; QUEIROZ, I. N. L.; COURA, C. O.; ARAÚJO, G. S.; BENEVIDES, N. M. B. Purificação, caracterização físico-química e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados da pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 3, p. 233-241, 2011.
- SAKAI, S.; KIM, W. S.; LEE, I. S.; KIM, Y. S.; NAKAMURA, A.; TOIDA, T.; IMANARI, T. Purification and characterization of dermatan sulfate from the skin of the eel, *Anguilla japonica*. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 3, p. 263-269, 2003.
- SOUZA, M. L. S.; DELLIAS, J. M. M.; MELO, F. R.; SILVA, L. C. F. Structural composition and anticoagulant activity of dermatan sulfate from the skin of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L.). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 147, n. 3, p. 387-394, 2007a.
- SOUZA, M. L. S.; FREITAS, C. F.; DOMINGOS, M. A. O.; NUNES-TAVARES, N.; HASSON-VOLOCH, A.; NASCIUTTI, L. E.; SILVA, L. C. F. Identification and distribution of chondroitin sulfate in the three electric organs of the electric eel, *Electrophorus electricus* (L.). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, n. 2, p. 227-233, 2007b.
- TINGHO, M. G.; KOLSET, S. O.; OFSTAD, R.; ENERSEN, G.; HANNESSON, K. O. Sulfated glycosaminoglycans in the extracellular matrix of muscle tissue in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Spotted wolffish (*Anarhichas minor*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, n. 3, p. 349-357, 2005.
- WATANABE, W. O.; LOSORDO, T. M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEZ, F. Tilapia production systems in the Americas: technological advances, trends and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v. 10, n. 3-4, p. 465-498, 2002.
- WU, M.; XU, S.; ZHAO, J.; KANG, H.; DING, H. Physicochemical characteristics and anticoagulant activities of low molecular weight fractions by free-radical depolymerization of a fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber *Thelenata ananas*. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 716-723, 2011.

Received on December 22, 2008.

Accepted on January 28, 2010.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.