



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ - MACAÉ
CURSO DE FARMÁCIA



Campus UFRJ-Macaé
Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Isolamento e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da
macroalga marinha *Gracilaria caudata***

Bianca Barros da Costa

Macaé
Julho/2013

Costa, Bianca Barros da, 1990-
Isolamento e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da
macroalga marinha *Gracilaria caudata* / Bianca Barros da Costa. - 2013
41 f.

Orientador: Leonardo Paes Cinelli.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) – Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Curso de farmácia, 2013.

1. Bioquímica. 2. Glicídeos. 3. *Farmacognosia*. I. Cinelli, Leonardo Paes.
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Curso de Farmácia. III. Isolamento
e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da macroalga
marinha *Gracilaria caudata*.

Bianca Barros da Costa

Isolamento e atividade
anticoagulante dos polissacarídeos
sulfatados da macroalga marinha
Gracilaria caudata

Monografia apresentada ao Curso
de Farmácia da Universidade
Federal do Rio de Janeiro como
um dos requisitos para obtenção
do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli

Macaé
Julho/2013

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de tudo agradeço a Deus, pois sem Ele nada sou e nada seria possível. Ele foi quem me sustentou, me deu forças e coragem para sempre seguir em frente e nunca desistir, mesmo em meio a tantas dificuldades e problemas que surgiram ao longo dessa nova e difícil caminhada.

Agradeço também aos meus pais, Ademir e Lucia, que sempre estiveram perto, me apoiando e consolando em todas das fases da minha vida. Sou grata por tudo que vocês são para mim e por tudo que têm feito por mim sem sequer pedir nada em troca. Vocês são a base da minha vida!

À minha irmã Bruna pelo suporte, atenção e carinho dedicados a mim em todos os momentos alegres e também nos tumultuosos. Obrigada por ter acreditado em mim e no meu potencial mesmo quando tudo parecia estar “desabando”. Amo você!

À minha amiga Thamyris, que ao longo desses anos se tornou uma irmã. Agradeço por todos os momentos de estudo, diversão, confissões e conversas até altas horas da noite. Por todas as vezes em que precisou ficar ouvindo as reclamações, lamentações e também as minhas ignorâncias rs. Você se tornou muito importante na minha vida, essencial!

Ao meu querido professor e orientador Leonardo, que foi uma peça fundamental para que todo esse trabalho pudesse ser desenvolvido e concretizado. Sou grata por toda atenção, carinho, dedicação, paciência, por todo aprendizado e por todos os conselhos dados que, com certeza, serão levados ao longo de toda minha vida.

Às “meninas do lab”, Thamyris Moreira, Rayssa, Thamyris Brandão e Regina, que fizeram esse início de jornada científica ser ainda mais alegre e prazeroso.

Ao CNPq e FAPERJ pelo o apoio financeiro para a realização desse projeto.

Ao Prof. Paulo A. S. Mourão, ao estudante de doutorado Gustavo Ramalho, à Rosimere Ferreira da Costa e Leandra Sebastiana da Silva pela colaboração e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À todos os meus amigos que sempre estiveram junto comigo, chorando e rindo. Obrigada por todas as palavras de ânimo e também de “correção”, pelo suporte, pelas

risadas e pela companhia nas madrugadas viradas de estudo. Sem vocês, com certeza, esse ciclo da minha vida seria um total desastre.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, seja com elogios ou críticas, os meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação dos filos Phaeophyta, Chlorophyta e Rhodophyta.....	10
Figura 2	Estrutura do polissacarídeo sulfatado extraído do ouriço do mar <i>L. variegatus</i> , mostrando as unidades de açúcar repetitivas com a presença de grupos sulfato.....	12
Figura 3	Estrutura de fucoïdanas de <i>Chordafilume Fucusvesiculosus</i>	14
Figura 4	Estrutura representativa da galactana de algas vermelhas.....	16
Figura 5	Estrutura básica repetitiva de carragenanas e agaranas.....	17
Figura 6	Unidade repetitiva do dissacarídeo da heparina.....	18
Figura 7	Diagrama do mecanismo de coagulação sanguínea.....	19
Figura 8	Alga marinha <i>Gracilaria caudata</i>	23
Figura 9	Cromatograma dos polissacarídeos sulfatados totais extraídos da alga marinha <i>Gracilaria caudata</i> em cromatografia de troca-iônica (DEAE-celulose).....	27
Figura 10	Eletroforese em gel de agarose das frações ricas em polissacarídeos sulfatados do extrato da alga marinha <i>Gracilaria caudata</i>	28
Figura 11	Atividade anticoagulante das frações polissacarídicas 0,3 e 0,5M, obtidas por cromatografia de troca-iônica (DEAE-celulose) da alga <i>Gracilaria caudata</i>	29
Figura 12	a) Espectro de RMN ¹ H do polissacarídeo sulfatado de <i>L. variegatus</i> .. b) Estrutura do tetrassacarídeo repetitivo de <i>L. variegatus</i>	30
Figura 13	a) Espectro de RMN ¹ H do polissacarídeo sulfatado de <i>E. lucunter</i> b) Estrutura do monossacarídeo repetitivo de <i>E. lucunter</i>	31
Figura 14	a) Expansão dos espectros unidimensionais (¹ H) da Fração 0,3M a 800MHz..... b) Expansões da região de 5,4 - 5,0 ppm.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Propriedades anticoagulantes da galactana sulfatada extraída da alga vermelha <i>B. occidentalis</i> em comparação com o padrão heparina	19
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATÖES

aPTT – Tempo de tromboplastina parcialmente ativada

CS – Condroitim sulfato

CETAVLON –Cetiltrimetil amônio

DMB –Azul de dimetilmetileno (do inglêš *dimetilmethylene blue*)

EDTA –Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglêš *ethylenediamine tetra-acetic acid*)

FPA – Fibrinopeptídeo A

FPB – Fibrinopeptídeo B

GAG – Glicosaminoglicanos

HEP – Heparina

PS – Polissacarídeos sulfatados

RMN – Ressonância magnética nuclear

TFPI –Inibidor do fator tissular (do inglêš *tissue factor pathway inhibitor*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Algas marinhas.....	9
1.1.1 Características gerais.....	9
1.1.2 Importância das algas.....	11
1.2 Polissacarídeos sulfatados	12
1.3 Polissacarídeos sulfatados de algas.....	13
1.3.1 Polissacarídeos sulfatados de algas pardas.....	13
1.3.2 Polissacarídeos sulfatados de algas verdes.....	14
1.3.3 Polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas.....	15
1.4 Atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Gerais.....	22
3.2 Específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Coleta da alga.....	23
4.2 Extração dos polissacarídeos.....	23
4.2.1 Obtenção do pó cetônico.....	23
4.2.2 Digestão proteolítica.....	24
4.3 Cromatografia de troca iônica.....	24
4.4 Eletroforese em gel de agarose.....	24
4.5 Teste aPTT.....	25
4.6 RMN.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Cromatografia de troca-iônica	26
5.2 Eletroforese em gel de agarose.....	27
5.3 Ensaio de aPTT	28
5.4 Ressonância Magnética Nuclear.....	29
6. CONCLUSÃO.....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

RESUMO

Organismos marinhos são ricos em numerosos compostos com múltiplas propriedades farmacológicas. Os polissacarídeos sulfatados tem chamado atenção de investigadores, uma vez que estão envolvidos em vários processos celulares, podendo apresentar potencial farmacológico, dentre as quais podem desempenhar papéis como antitrombótico, antioxidante, anticoagulante, antiviral, anti-inflamatório e agente anti-proliferativo (Silva *et al.*, 2011). Em algas, estes polissacarídeos sulfatados são constituintes complexos da matriz extracelular e possuem uma ampla variação estrutural, sendo isso um fator importante para determinação de suas funções biológicas específicas. A investigação dessas biomoléculas vem aumentando devido a seu ampla ação biológica. Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo a extração e caracterização estrutural dos polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha *Gracilaria caudata*. Inicialmente, a alga foi submetida à delipidação em acetona com posterior digestão proteolítica para a obtenção de um extrato bruto que foi, então, submetido à eletroforese em gel de agarose e à cromatografia em coluna de troca iônica (DEAE-celulose) com gradiente crescente (“step-wise”) de NaCl. O resultado da eletroforese mostra polidispersão com uma banda majoritária co-migrando com padrão de heparina. A cromatografia em DEAE-celulose mostrou que houve eluição de polissacarídeos sulfatados nas concentrações de 0,3 e 0,5 M de NaCl, não sendo detectável a eluição dos mesmos nas demais concentrações (1,0 ; 1,5 ; 2,0 ; 2,5 ; 3,0 ; 4,0 M). Em seguida, esses polissacarídeos eluídos foram submetidos a teste de tempo de tromboplastina parcialmente ativado (aPTT), onde o tempo de coagulação foi prolongado até o limite de 300 segundos, utilizando-se aproximadamente 95µg e 89µg das frações 0,3M e 0,5M, respectivamente. Adicionalmente, realizamos espectro de ressonância magnética nuclear unidimensional de prótons da fração eluída em 0,3 M de NaCl, o qual possibilitou a identificação de quatro sinais anoméricos, sugerindo que este polissacarídeo sulfatado é composto por um tetrassacarídeo repetitivo. Nossos dados mostram que os polissacarídeos sulfatados extraídos da alga *G. caudata* possuem atividade anticoagulante e sugerimos que a fração eluída com 0,3 M de NaCl possui composição monossacarídica repetitiva, similar a outros já descritos na literatura. Por fim, pretende-se caracterizar estruturalmente esses polissacarídeos sulfatados e estudar suas possíveis atividades biológicas com base em sua estrutura, visto a importância do surgimento de novas moléculas biologicamente ativas para o desenvolvimento de novos fármacos.

Palavras chave: Polissacarídeos sulfatados, Alga marinha, Atividade anticoagulante, *Gracilaria caudata*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Algas Marinhas

1.1.1 Características gerais

As algas marinhas são consideradas um grupo de seres aquáticos autotróficos, fotossintetizantes. Elas podem ser encontradas em diversos ambientes marinhos e continentais, podendo exercer a função de proteção para outros organismos, como invertebrados e peixes. São utilizadas como fonte de proteínas, carboidratos e outras moléculas por diversos organismos aquáticos, representando a base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos. As algas apresentam uma estrutura variada, com a presença de parede celular composta de celulose, porém não possuem folhas, raízes ou tecidos vasculares (Van denHoeck *et al.*, 1995).

Sua classificação é bem diversificada, porém, na maioria das vezes, as algas são classificadas com base na coloração característica dos pigmentos presentes nelas. Podem ser classificadas em três grupos: Phaeophyta (marrons/pardas), Chlorophyta (verdes) e Rhodophyta (vermelhas), representadas na Figura 1 (Raven, Evert e Eichhorn, 2001). Alguns autores consideram também a classificação em Cyanophyta, ou algas azuis (cianobactérias), que representam os organismos procariontes cujas células não possuem núcleo definido, mitocôndria e os tilacóides ficam dispersos no citoplasma. Os pigmentos que ditam a sua cor azul-esverdeadas são ficocianina e aloficocianina (Raven, Evert e Eichhorn, 2007).

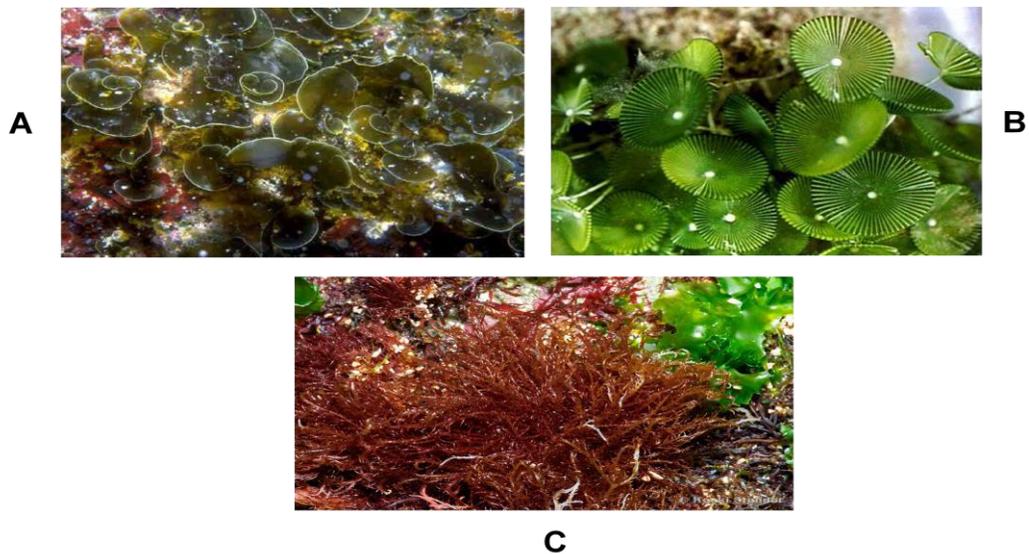


Figura 1: Representantes dos filios A) Phaeophyta (algas marrons) – *Lobophora variegata*; B) Chlorophyta (algas verdes) – *Acetabularia acetabulum*; C) Rhodophyta (algas vermelhas) – *Hypnea musciformis*.
 Fontes: www.horta.uac.pt/.../lobophora_variegata.html ; www.taringa.net; www.seaweedindustry.com
 Acesso em: 07/06/13

As algas pardas, do filo Phaeophyta, são multicelulares e podem ser encontradas em maior abundância nas costas frias, em águas boreais e polares. São descritas cerca de 2000 espécies. Este tipo de alga, além de possuir clorofilas tipo a e c, seus cloroplastos também contêm vários carotenóides, que incluem a fucoxantina e a xantofila, responsáveis pela cor marrom escura, característica desse filo (Raven, Evert e Eichhorn, 2007).

As algas verdes, pertencentes ao filo Chlorophyta, podem possuir estrutura unicelular ou multicelular. Incluem, em sua maioria, algas aquáticas. Porém também podem ser encontradas em outras variedades de *habitats*, tais como troncos de árvores, solo e em simbiose com líquens, protozoários e esponjas. São descritas cerca de 1700 espécies desta classificação. Elas também possuem clorofilas tipo a e b além de uma grande quantidade de carotenóides. Adicionalmente, possuem a capacidade de armazenamento de amido em seus cloroplastos (Raven, Evert e Eichhorn, 2007).

As algas vermelhas, do filo Rhodophyta, estão presentes, predominantemente, em águas tropicais e quentes, porém também podem ser encontradas em regiões mais frias do mundo. Estão descritas aproximadamente de 4000 a 6000 espécies, sendo que apenas 100 delas habitam corpos de água doce. A ficoeritrina é o pigmento, presente

nas algas vermelhas, que confere a cor característica delas por mascarar a cor verde da clorofila tipo a. Também são encontrados os pigmentos ficocianina e aloficocianina, porém em menores quantidades. Essas algas possuem clorofila tipo d, diversos carotenóides e a principal substância de reserva é o amido, armazenado no citoplasma (Raven, Evert e Eichhorn, 2007).

1.1.2 Importância das algas

As algas, como dito anteriormente, formam a base da cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos. Isso se deve à sua maior eficiência fotossintética, sendo responsável por cerca de 40-50% da fixação de carbono e produção de oxigênio do planeta. Associado a isso, elas desempenham papel vital na manutenção dos ecossistemas aquáticos porque incorporam energia solar em biomassa através da fotossíntese, atuam no ciclo dos elementos químicos e na mineralização, em processos de biorremediação e como indicadores de poluição, por serem altamente sensíveis (Katz *et al.*, 2004; Vidoti e Rollemberg, 2004).

Diversos estudos sobre espécies do *habitat* marinho mostram que estes são uma rica fonte de compostos bioativos. As algas apresentam vantagem sobre os demais por apresentar uma maior facilidade de obtenção, quando comparada a esponjas e ascídias, por exemplo. Além disso, apresentam amplo potencial de cultivo, o que gera uma maior procura destas pelas indústrias (Gombotz e Wee, 1998). Inúmeras atividades biológicas de algas já foram relatadas, incluindo atividades como antioxidantes, antivirais, anticoagulantes, antimicrobiana, dentre outras, o que demonstra o amplo potencial destes organismos (Smit, 2004).

Do ponto de vista alimentício e nutricional, as algas também exercem um importante papel. Em muitos países há o consumo de grandes quantidades de algas, pois estas fornecem fibras, minerais e vitaminas. No entanto, existe uma exploração indiscriminada dos bancos naturais. Por tal motivo, observa-se que nas últimas décadas houve um esforço maior para que se desenvolvessem técnicas de cultivo em larga escala (Cardozo *et al.*, 2007).

As algas vermelhas são as mais exploradas no Brasil. Dentre elas os gêneros *Gracilaria* e *Hypnea* são as mais utilizadas devido ao processamento e produção de agar, particularmente na costa nordestina, se estendendo do Ceará até a Paraíba. (Oliveira *et al.*, 2002). Pode-se destacar a bioprospecção das algas *Gracilaria cornea*, *G. caudata* e *Gracilaria sp.* Já as do gênero *Hypnea*, são mais utilizadas na produção de um ficolóide de grande valor econômico, o kapa-carragenana (Oliveira *et al.*, 2002).

1.2 Polissacarídeos Sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas complexas, que possuem uma estrutura química rica em poliânions, apresentando-se como polímeros formados por unidades de açúcar repetitivas carregados negativamente, devido à presença de grupos sulfato (Figura 2). Essas características, que em última instância possibilitam sua ligação a um grande número de proteínas, são responsáveis pelas inúmeras atividades biológicas (Arfors e Ley, 1993).

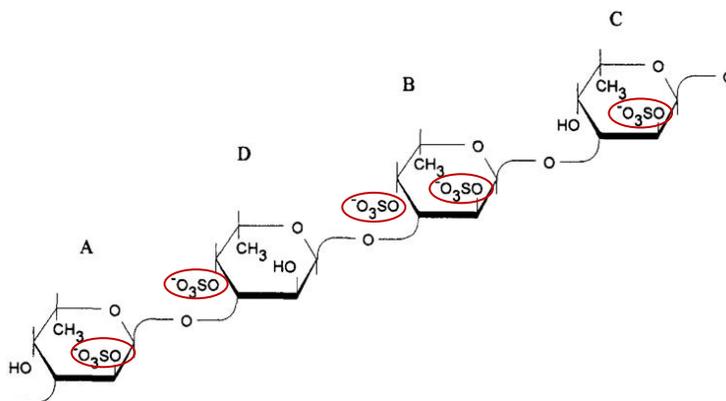


Figura 2: Estrutura do polissacarídeo sulfatado extraído do ouriço do mar *L. variegatus*, mostrando as unidades de açúcar repetitivas com a presença de grupos sulfato.
Fonte: Mulloy *et al.*, 1994

Podem ser subdivididos em 3 classes distintas: fucanas sulfatadas, galactanas sulfatadas e glicosaminoglicanos.

Apresentam-se amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em microrganismos, animais (vertebrados e invertebrados) e também em algas

marinhas, sendo, entretanto, até então consideradas ausentes nas plantas superiores (Dietrich *et al.*, 1985; Yoon *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2004).

1.3 Polissacarídeos sulfatados de algas

As algas marinhas são uma das principais fontes de polissacarídeos sulfatados já estudadas. Nestes organismos, os PS podem ser encontrados em diversas formas, variando conforme o tipo de alga (Sousa, 2010).

Os PS, assim como os demais polissacarídeos, podem apresentar uma heterogeneidade estrutural, porém esta se demonstra mais acentuada quando comparada às dos polissacarídeos neutros, carboxilados ou dos fosforilados, já que pode ocorrer variação no grau de sulfatação e na posição de substituição dos sulfatos na molécula (Boisson-Vidal *et al.*, 1995; Haron-Bouhedja *et al.*, 2000). Nos itens a seguir nos concentraremos em discutir com mais profundidade a relação entre a variação de estrutura e classe de algas.

1.3.1 Polissacarídeos sulfatados de algas pardas

Os PS presentes nas algas pardas possuem em sua constituição, majoritariamente ou exclusivamente, as fucanas (Quillet, 1961). Em sua maioria são fucanas ramificadas e com padrão de sulfatação irregular (Bilanet *et al.*, 2004). Além disso, podem estar na forma de homo ou heteropolissacarídeos. Aqueles que possuem até 90% de *L*-fucose, são chamados de fucanas e os demais de fucoidans, porém alguns autores empregam esses termos como sinônimos (Berteau e Mulloy, 2003).

As estruturas dos PS podem diferir conforme a variação das espécies de algas e podem ainda variar dentro da mesma espécie. Como exemplo, tem-se as alterações que podem ocorrer no padrão da ligação glicosídica nas fucanas (Ushakova, 2009), isso inclui as de *Laminaria saccharina*, *L. digitata*, *Analipus japonicus*, *Cladosiphon okamuranus* e *Chordafilum* (Figura 3) que têm suas cadeias centrais compostas de unidades de α -(1→3)-*L*-fucopirranose, e também as fucanas isoladas de *Ascophyllum nodosum* e *Fucus vesiculosus*, espécies que têm suas cadeias centrais compostas de

repetição α -(1 \rightarrow 3) e α -(1 \rightarrow 4)-L-fucopirranose (Yang *et al.*, 2011). Devido a essa heterogeneidade das estruturas, as diferentes condições de extração utilizadas por investigadores, podem originar o isolamento de formas distintas de fucanas (Li, 2008).

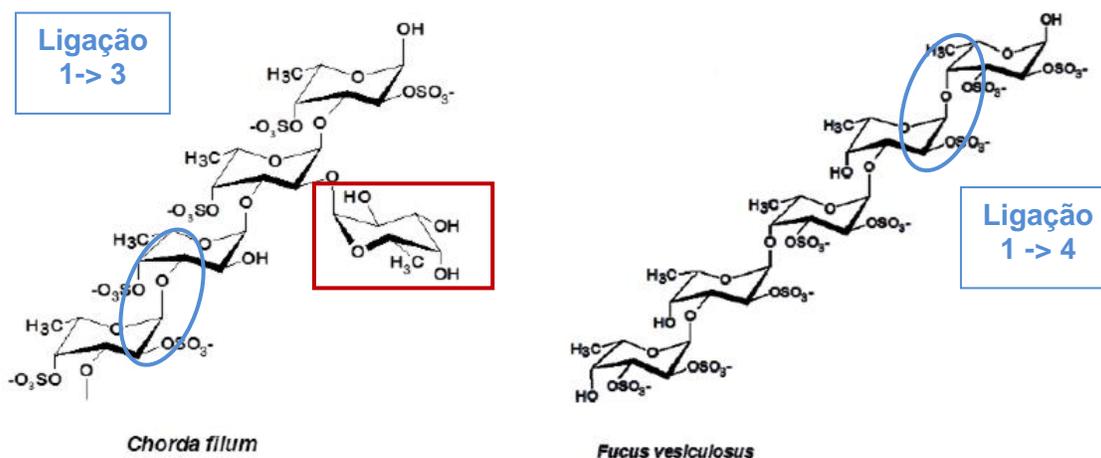


Figura 3: Estrutura de fucoidans de *Chorda filum* e *Fucus vesiculosus*, mostrando a diferença no tipo de ligação glicosídica (—) e na possibilidade de ramificação (—). Retirado de Chizhov *et al.*, 1999

1.3.2 Polissacarídeos sulfatados de algas verdes

Nas algas verdes, os polissacarídeos sulfatados são mais heterogêneos que em algas pardas, mostrando uma estrutura com grande complexidade e variabilidade. Normalmente, são ricos em galactose, manose, xilose, arabinose, glicose e erafinose (Siddhanta *et al.*, 1999).

Embora as algas vermelhas sejam a fonte mais comum de galactanas sulfatadas, algumas algas verdes, particularmente as do gênero *Codium*, são uma fonte significativa desses compostos (Love e Percival, 1964; Farias *et al.*, 2008). As galactanas sulfatadas, presentes nessas espécies de alga verde, tendem a possuir estruturas mais complexas e heterogêneas do que os seus homólogos em algas vermelhas. Algumas algas contêm arabinogalactana sulfatada e glucogalactana sulfatada (Love e Percival, 1964; Matsubara *et al.*, 2001). Existem relatos sobre uma galactana sulfatada altamente ramificada a partir *C. yezoense*, que contém uma cadeia linear de resíduos 3- β -D-

galactopiranoose contendo ramificações de oligossacarídeos curtos por meio de ligações (1 → 6). Nesta classe de PS, os grupos sulfato são encontrados principalmente em C-4e em pequenas quantidades em C-6 (Bilan, 2004).

As algas verdes também podem ser fontes de outros tipos de polissacarídeos sulfatados. Isso inclui, por exemplo, um heteropolissacarídeo obtido a partir de *Enteromorpha compressa* que é solúvel em água e pode estar ligado à ramnose na posição (1 → 2 ou 1 → 4), a xilose e a unidades ácido glucurônico na posição (1 → 4). Grupos sulfato, quando presentes, podem estar situados na posição C-3 de ramnose e C-2 de xilose (Ray, 2006).

1.3.3 Polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas

Em algas vermelhas, são encontrados homopolissacarídeos de galactose sulfatadas, também conhecidas como carragenanas e agaranas. Esses termos são utilizados, de maneira geral, para referir-se a uma família de polissacarídeos sulfatados que tem suas propriedades gelificantes alteradas por variações intramoleculares, as quais geram interações intermoleculares. Esses polímeros podem formar fortes géis a baixas concentrações em soluções aquosas. O comportamento dessas redes tridimensionais, é baseado na auto-associação da estrutura primária regular desses polissacarídeos. Essa característica promove a formação de grandes agregados, que somente se dissociam em maiores temperaturas e/ou em presença de agentes quelantes e/ou sais. Além disso, esses polímeros ainda podem apresentar substituições de seus grupos hidroxila por grupamentos metil, piruvato, ésteres de sulfato ou às vezes por monossacarídeos adicionais (Usov, 1998; Lahaye, 2001).

A estrutura dessas moléculas pode variar entre as espécies de algas. Além do tipo de enantiômero encontrado, o padrão de sulfatação é outro fator importante de distinção destas moléculas, visto que tanto a quantidade como a posição dos sulfatos apresentam relação direta com a atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados (Farias *et al.*, 2008).

As carragenanas e agaranas apresentam cadeia linear com ligações alternadas do tipo 3-β-D-galactopiranoose (unidade A) e 4-α-galactopiranoose (unidade B) entre as

unidades, o que mostra uma unidade repetitiva de dissacarídeos similar a dos glicosaminoglicanos (GAGs), sendo que a sulfatação pode ocorrer em diferentes pontos (Usov,1998). Assim, asgalactanas formam um arranjo alternado entre as unidades A e B, ou seja, (AB)_n (Figura 4).

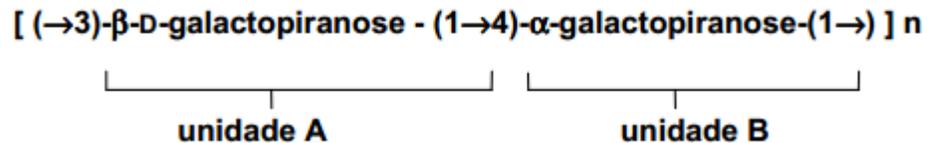


Figura 4: Estrutura representativa da galactana de algas vermelhas, formando um arranjo alternado entre as unidades A e B. Modificado de Painter, 1983.

A principal diferença estrutural entre esses PS está no fato de a unidade B do dissacarídeo básico (alfa-galactopiranosose) ser um estereoisômero *L* nos ágares e *D* nas carragenanas, enquanto que os resíduos de beta-galactopiranosose sempre pertencerem à série estereoisomérica *D* (Figura 5) (Usov,1998; Lahaye, 2001).No entanto, podem ocorrer variações estruturais devido à origem da galactana. Dependendo da espécie da alga analisada, as unidades de alfa-galactopiranosose podem apresentar-sena forma ciclizada de 3,6-anidro-alfa-L-galactose (Stortz e Cerezo, 1991).

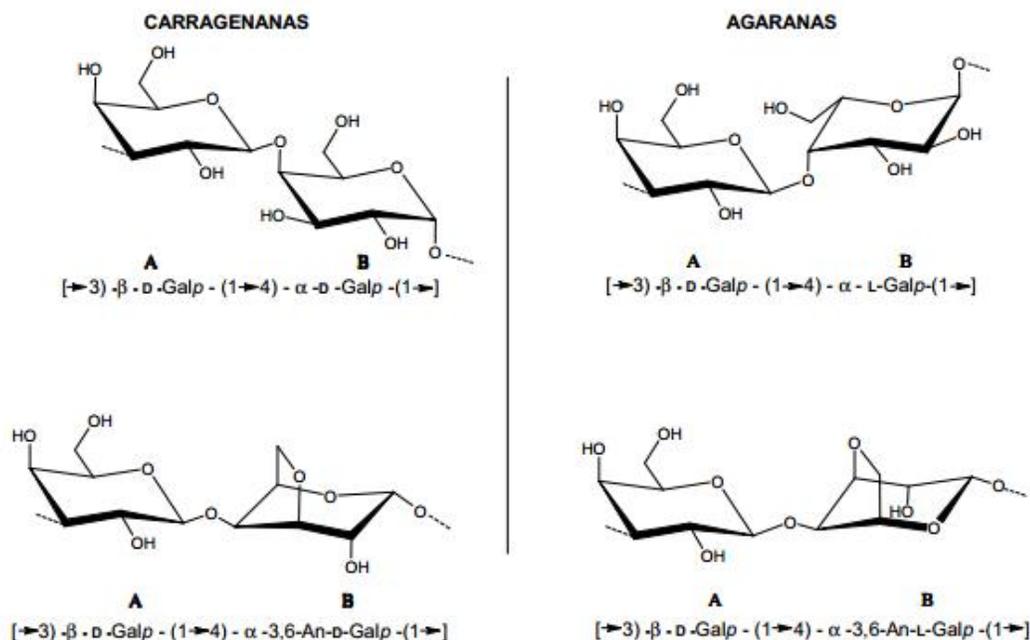


Figura 5: Estrutura básica repetitiva de carragenanas e agaranas. Modificado de Painter, 1983.

1.4 Atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados

Os PS são conhecidos por modular diversas funções biológicas. Já foram demonstradas atividades como anticoagulante (Anderson *et al.*, 1976; Pereira *et al.*, 1999; Mourão e Pereira, 2000; Pereira *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2005), antitrombótica (Mourão e Pereira, 2000; Mourão, 2004), antitumoral (Soeda *et al.*, 1994), antiproliferativa (Costa *et al.*, 2010), antiaterosclerótica (Engelberg, 1991), antiviral (Damonte *et al.*, 1994), antioxidante (Zhang *et al.*, 2003), anti-inflamatória (Berteau e Mulloy, 2003) e antinociceptiva (Vieira *et al.*, 2004). No entanto, as ações como anticoagulante e antitrombótico são as mais estudadas (Mourão e Pereira, 2000), por isso, este item terá o foco nestas duas atividades, visto que também é o objetivo desse trabalho.

A heparina é um polissacarídeo sulfatado de origem animal (Figura 6). Foi o primeiro fármaco utilizado como anticoagulante e ainda continua sendo o anticoagulante mais utilizado, mesmo depois de 60 anos. Ele possui sítios de ligação diversificados

(Weizt, 1994) e seu mecanismo de ação baseia-se na sua ligação com a antitrombina e ao cofator II da heparina, inibindo a formação de trombina, do coágulo de fibrina e, conseqüentemente, a coagulação sanguínea (Figura 7) (Mourão e Pereira, 2000).

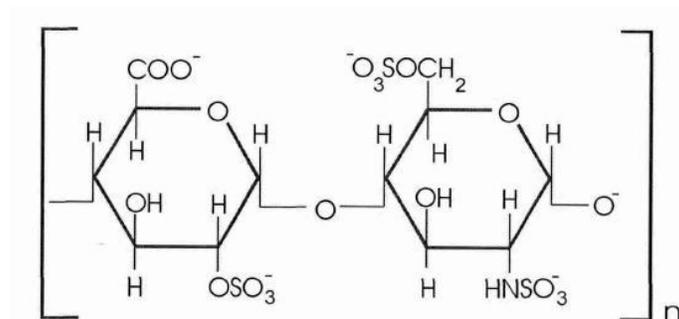


Figura 6: Unidade repetitiva do dissacarídeo da heparina.
Fonte: Coelho e Laranjeira, 2004

Todavia, a heparina possui diversas limitações, podendo provocar algumas reações adversas indesejáveis. Dentre elas pode-se citar a trombocitopenia, a osteoporose, a alteração no metabolismo de lipídeos e hemorragias, fazendo-se necessário o monitoramento frequente de seu uso. Além disso, é obtida de intestino suíno ou pulmão bovino, o que pode trazer risco de contaminação aos pacientes por partículas virais ou outros agentes. Tais fatores levam à busca de novas substâncias com o mesmo potencial biológico, se possível, sem os riscos envolvidos na sua administração (Pereira *et al.*, 2002).

Os PS de algas marinhas apresentam-se como um dos principais grupos de substâncias com amplo potencial anticoagulante e antitrombótico. Sendo assim, são considerados como promissoras moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos em substituição à heparina ou como terapia alternativa. Isso se deve à grande diversidade estrutural dessas moléculas, o que fornece a possibilidade de atuação em outras vias, com diferentes mecanismos de ação (Rocha *et al.*, 2006).

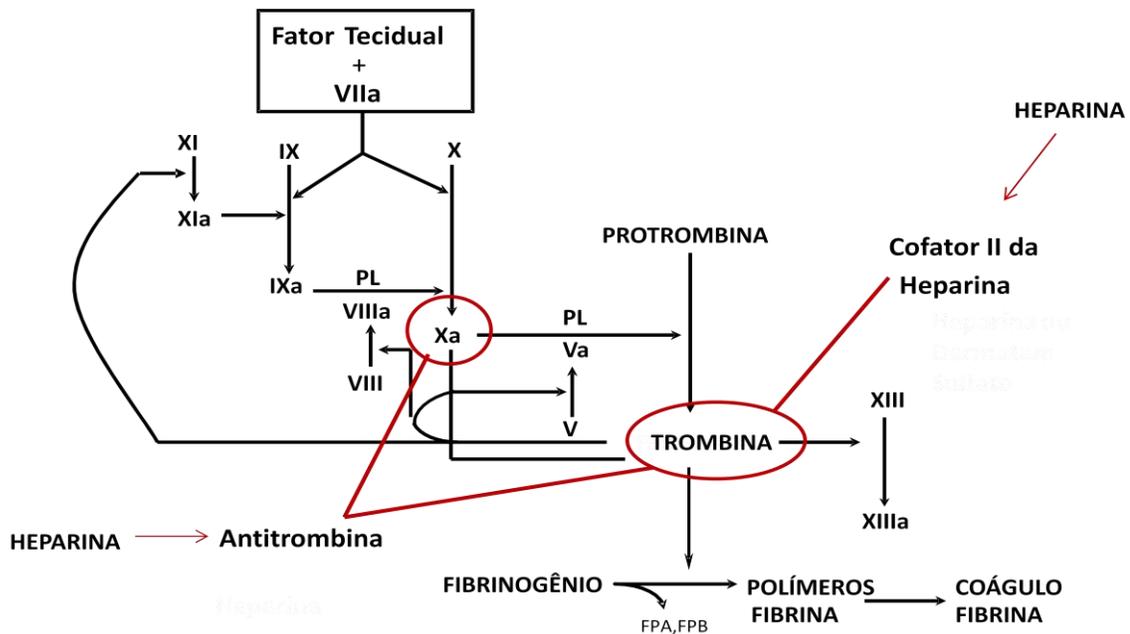


Figura 7: Diagrama do mecanismo da coagulação, indicando a ação da heparina sobre a antitrombina e cofator II da heparina. Modificado de Rocha *et al.*, 2006.

A *D*-galactana sulfatada extraída da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* é descrita como um polissacarídeo com atividade anticoagulante semelhante à heparina, por potencializar a inibição da trombina e do fator Xa na presença de antitrombina e/ou cofator II da heparina (Farias *et al.*, 2000). Isso pode ser mais bem visualizado na tabela I, onde é mostrada a comparação da atividade do padrão heparina e da galactana sulfatada de *B.occidentalis*.

Polysaccharide	Source	Sulfat	Tabela I				
			APTT ^a	IC ₅₀ ^b			
			Thrombin/antithrombin	Thrombin/heparin cofactor II	Factor Xa/antithrombin		
			<i>mol/mol</i>	<i>IU/mg</i>	<i>µg/ml</i>		
Sulfated galactan	<i>B. occidentalis</i> (Fig. 1A)		1.5 ^c	130 ± 10	0.06 (±0.01)	0.03 (±0.01)	0.10 (±0.03)
	<i>E. lucunter</i> (Fig. 1B)		1.0 ^d	20 ± 3	3 (±0.08)	6 (±0.09)	20 (±3)
	<i>H. monus</i> (Fig. 1C)		1.0 ^d	~2	>500	>500	>500
Sulfated fucan	<i>S. franciscanus</i> (Fig. 1D)		1.0 ^d	~2	>500	>500	250
Heparin ^e			1.3 ^d	193	0.01 (±0.01)	0.5 (±0.10)	0.04 (±0.02)
Dermatan sulfate			0.5 ^d	4	>500	0.7 (±0.2)	>500

Tabela I : Propriedades anticoagulantes da galactana sulfatada de *B. occidentalis* em comparação com o padrão heparina. Retirado de Melo *et al.*, 2004.

extratos de algas do gênero *Laminaria* (Kimura, 1941). A ação destes compostos se dá, principalmente, pela potencialização da ligação dos anticoagulantes naturais

(antitrombina e cofator II da heparina) aos cofatores da coagulação. No entanto a inibição, em menor escala, do fator Xa da cascata de coagulação também pode ocorrer (Nishino *et al.*,2000).

Algumas fucanas podem possuir ação na alteração do processo de coagulação, promovendo a liberação do TFPI (inibidor do fator tecidual) ou de heparam sulfato, um glicosaminoglicano sulfatado produzido pelas células endoteliais, que apresenta ação antitrombótica. As fucanas A,B e C extraídas da alga *Spatoglossum schroederi*, por exemplo, quando submetidas a testes anticoagulantes *in vitro* não apresentaram nenhuma atividade. Entretanto, as fucanas A e B apresentaram atividade antitrombótica *in vivo*, que foi atribuída ao fato destas estimularem a síntese de heparam sulfato (Barroso *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a infinidade de estruturas químicas possíveis de serem exploradas e os possíveis papéis farmacológicos/biológicos que polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas marinhas possuem, definimos devido a falta de informações sobre a estrutura de polissacarídeos sulfatados da alga *G.caudata* estudar esta espécie. Além disso, existem diversos efeitos adversos provocados pelo uso de heparina, então há uma busca de novas substâncias sem os riscos envolvidos na sua administração, como já anteriormente citado (Pereira *et al.*, 2002). A exemplo da galactana sulfatada de *B. occidentalis*, a qual possui potência comparável à heparina, esse trabalho também se inspira na prospecção de moléculas bioativas. Sem essa etapa inicial seria impossível encontrar novos fármacos ou protótipos a fármacos, visto que a síntese ou semi-síntese dessas moléculas ainda não é possível de ser feita em laboratório. Outro fato que deve ser pontuado é que com os constantes trabalhos de elucidação estrutural publicados na literatura foi possível formar uma biblioteca de estrutura de carboidratos (“carboidratoteca”) que tornou-se uma ferramenta importante para a avaliação dos requisitos estruturais fundamentais na manutenção ou potencialização da sua atividade biológica, tanto a anticoagulante (analisada neste trabalho), quanto outras tantas passíveis de serem examinadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

Avaliação químico-biológica dos polissacarídeos sulfatados presentes na alga marinha *Gracilaria caudata*.

3.2. Específicos

- Extração dos polissacarídeos sulfatados,
- Isolamento e purificação dos polissacarídeos sulfatados,
- Análise estrutural dos polissacarídeos sulfatados e
- Avaliação de seu potencial biológico como anticoagulante em testes *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta da alga

A alga *G. caudata* (Figura 8) foi gentilmente coletada na Praia da Barrinha - Icapui - Ceará, identificada pela bióloga marinha e coordenadora do Projeto “Mulheres de Corpo e Alga” Rosimere Ferreira da Costa e enviada limpa em novembro de 2011 pela técnica Leandra Sebastiana da Silva.

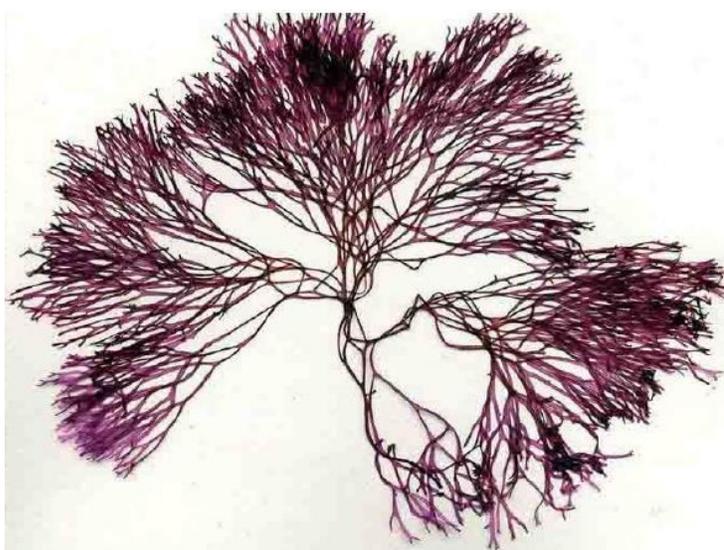


Figura 8:Alga marinha *Gracilaria caudata*. Fonte: Costa, Leandro Silva; 2008.

4.2 Extração dos polissacarídeos sulfatados (PS)

4.2.1 Obtenção do pó cetônico

A alga foi seca (60°C por 24 horas), triturada e submetida à despigmentação e delipidificação em acetona por 24 horas. Posteriormente, a mistura foi decantada, o excesso de acetona foi descartado e a alga foi secada novamente (60°C por 24 horas). Este resíduo obtido foi denominado “pó cetônico”.

4.2.2 Digestão proteolítica

Para realização desta etapa, misturou-se ao pó cetônico tampão de digestão (acetato de sódio 0,1 M, EDTA 5mM, cisteína 5 mM em pH 5,0) e, aproximadamente, 10% do peso seco do pó cetônico em papaína à 60°C por 24 horas para a extração dos polissacarídeos sulfatados totais. A suspensão foi filtrada e centrifugada em centrífuga clínica (2000rpm por 5 min). Esse procedimento foi realizado tantas vezes quanto necessário para que houvesse o esgotamento da extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha. O esgotamento foi definido utilizando a metodologia de detecção por azul de dimetil metileno (DMB), conforme explicada posteriormente. O sobrenadante da extração foi recolhido e armazenado para testes posteriores.

4.3 Cromatografia de troca iônica

Os polissacarídeos totais extraídos foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada e lavada com tampão de equilíbrio (Tris-HCl 40 mM, EDTA 50 mM em pH 7,4). Os polissacarídeos sulfatados foram eluídos com o mesmo tampão contendo NaCl em diferentes concentrações (0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 M) e foram monitorados (A_{525nm}) por meio da propriedade metacromática com azul de dimetil metileno (DMB). As frações que possuíam polissacarídeos sulfatados foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e concentradas por liofilização para os ensaios posteriores. A detecção dos polissacarídeos sulfatados foi feita através da identificação de metacromasia do DMB, sendo a variação da coloração de azul para rósea, na presença de polissacarídeos sulfatados. Com isso, adicionou-se cerca de 10 μ L de material em 1mL de DMB, para verificar a presença de PS que se manifestava pela mudança na coloração do corante.

4.4 Eletroforese em gel de agarose

As frações cromatografadas, em que se detectou polissacarídeos sulfatados, foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão 1,3 - acetato

diaminopropano/benzina (pH 9,0) como descrito (Dietrich e Dietrich, 1976). O gel preparado foi colocado sobre lâminas de vidro. As amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em cuba resfriada a 4°C. O gel foi submetido a 100 V por aproximadamente 60 minutos. Após a corrida, os polissacarídeos sulfatados no gel foram fixados durante 12 h com brometo de cetiltrimetil amônio (Cetavlon) 0,1 % em água destilada à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi desidratado e corado com azul de toluidina 0,1 % e descorado por ácido acético / etanol / água (0,1 : 5 : 5, v/v). Para as eletroforeses realizadas, foram utilizados glicosaminoglicanos sulfatados como padrões (condroitim sulfato - CS e heparina - HEP).

4.5 Teste de aPTT

Plasma humano foi coletado em uma solução de citrato de sódio 3,8% na proporção de 9:1 e analisado pelo tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) (Anderson *et al.*, 1976). Para as análises de aPTT foi utilizado como controle positivo, heparina (193 UI/mg). Neste ensaio 90 µL de plasma foram incubadas com 10 µL de soluções com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados ou heparina e NaCl 0,9% . Logo após, 100 µL de cefalina ativada (ReagentCelite, Biolab, Mérieux) foi adicionado à mistura e incubado por mais 2 minutos. Em seguida, 100 µL CaCl₂ 0,25 M foi acrescentado e o tempo de coagulação foi registrado em um microcoagulômetro da Amelung, modelo KC4A (Melo *et al.*, 2008).

4.6 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Bruker DRX 800 MHz utilizando uma sonda de tripla ressonância de 5 mm. Utilizou-se de aproximadamente 10 mg de amostra dissolvidas em 0,5 mL de D₂O 99,9%. Os experimentos foram realizados a 60°C com supressão de D₂O por presaturação. Foi realizado espectro unidimensional (detecção direta de ¹H).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cromatografia de troca-iônica

Após a extração dos polissacarídeos sulfatados por digestão proteolítica com papaína, os polissacarídeos totais obtidos foram submetidos à cromatografia de troca-iônica.

Os perfis cromatográficos obtidos em coluna de troca iônica (DEAE-celulose) indicaram a separação de duas diferentes frações de PS, eluídas nas concentrações 0,3 e 0,5 M de NaCl (Figura 9). O emprego de procedimentos cromatográficos, utilizando a matriz trocadora aniônica DEAE-celulose, tem sido eficiente na separação de frações de PS em várias espécies de algas marinhas. Isso se dá pelo fato de esta matriz ser carregada positivamente, enquanto que os polissacarídeos sulfatados são carregados negativamente. Logo, há uma interação entre a matriz e essas moléculas, que são posteriormente eluídas com tampão contendo concentrações crescentes de NaCl. Este, por sua vez, promove a “quebra” dessas interações, separando então os polissacarídeos sulfatados com diferentes padrões de sulfatação na molécula (Bezerra-Neto *et al.*, 2008).

A eficiência de separação se traduz em vantagens, tendo em vista o elevado grau de complexidade e heterogeneidade dos compostos presentes nas diferentes espécies de algas, dificultando a sua caracterização estrutural posterior, quando não é realizada essa abordagem metodológica de cromatografia (Zhang *et al.*, 2008).

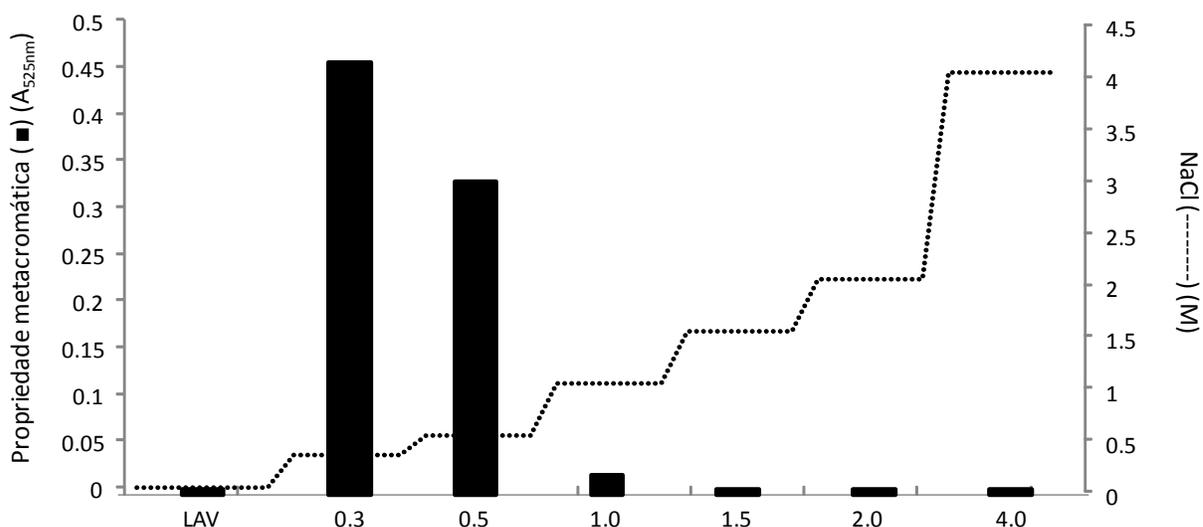


Figura 9: Cromatograma dos polissacarídeos totais extraídos da alga marinha *Gracilaria caudata* em cromatografia de troca-iônica (DEAE – celulose).

5.2 Eletroforese em gel de agarose

Após a separação dos polissacarídeos sulfatados, as frações obtidas na cromatografia, foram submetidas à análise em eletroforese em gel de agarose. Nesta técnica, a presença de polissacarídeos sulfatados pode ser observada pelo fato do corante azul de toluidina se complexar com compostos sulfatados, apresentando uma banda com coloração violeta. Além disso, é utilizado para produção do gel de agarose um tampão a base de diaminopropano. Este é carregado positivamente, logo há uma interação dos polissacarídeos sulfatados aplicados no gel com essa substância. Por isso, as moléculas com maior densidade de carga tendem a interagir mais com o gel, consequentemente migrando menos. O que pode indicar o provável padrão de sulfatação dos polissacarídeos sulfatados aplicados.

A eletroforese em gel de agarose revelou pequenas diferenças na mobilidade eletroforética entre as duas frações eluídas e o extrato bruto (Figura 10), já que o padrão de migração das três amostras aplicadas são similares e co-migram com a heparina, o que sugere alta densidade de carga negativa.

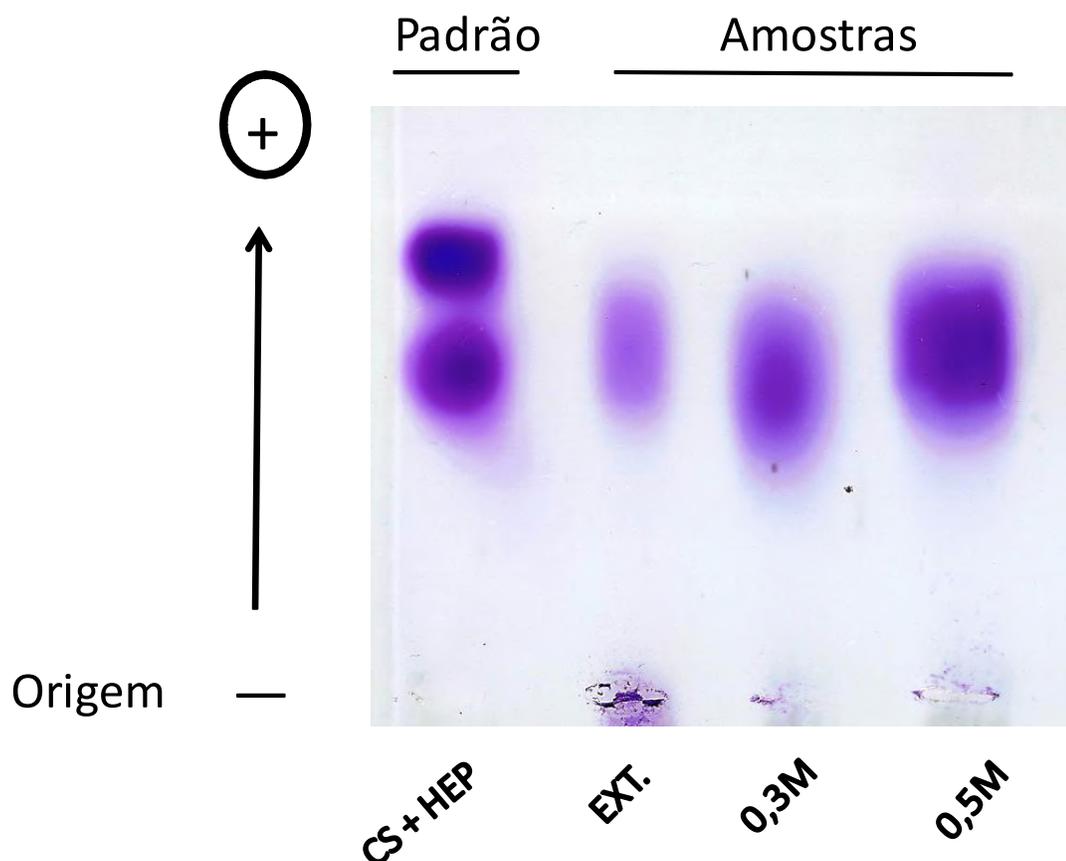


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose do extrato rico em polissacarídeos sulfatados e das frações da cromatografia de troca iônica (CTI) comparado aos padrões (heparina e condroitin sulfato).

5.3 Ensaio de aPTT

Posteriormente, as frações 0,3 e 0,5M foram submetidas a um ensaio de aPTT, o qual revelou que as frações de polissacarídeos sulfatados foram capazes de modificar o tempo normal de coagulação, que é de aproximadamente 30 segundos (Figura 11). A quantidade mínima de polissacarídeo sulfatado para prolongar o aPTT em 300 segundos foi de aproximadamente 95 μ g na fração eluída com 0,3 M de NaCl e 89 μ g na fração eluída com 0,5 M de NaCl. Desta forma, as duas frações testadas mostraram possuir atividade anticoagulante, porém essa atividade ainda é considerada baixa quando comparada à da heparina, cerca de 170 vezes menor. Entretanto, testes utilizando enzimas purificadas da cascata de coagulação deverão ser realizados para

determinação do seu mecanismo específico de ação anticoagulante. Este pode ser semelhante ao da heparina, atuando então na potencialização da ligação entre a antitrombina e o cofator II de heparina aos cofatores da coagulação, ou através da inibição do cofator Xa, ou através de algum outro mecanismo ainda desconhecido.

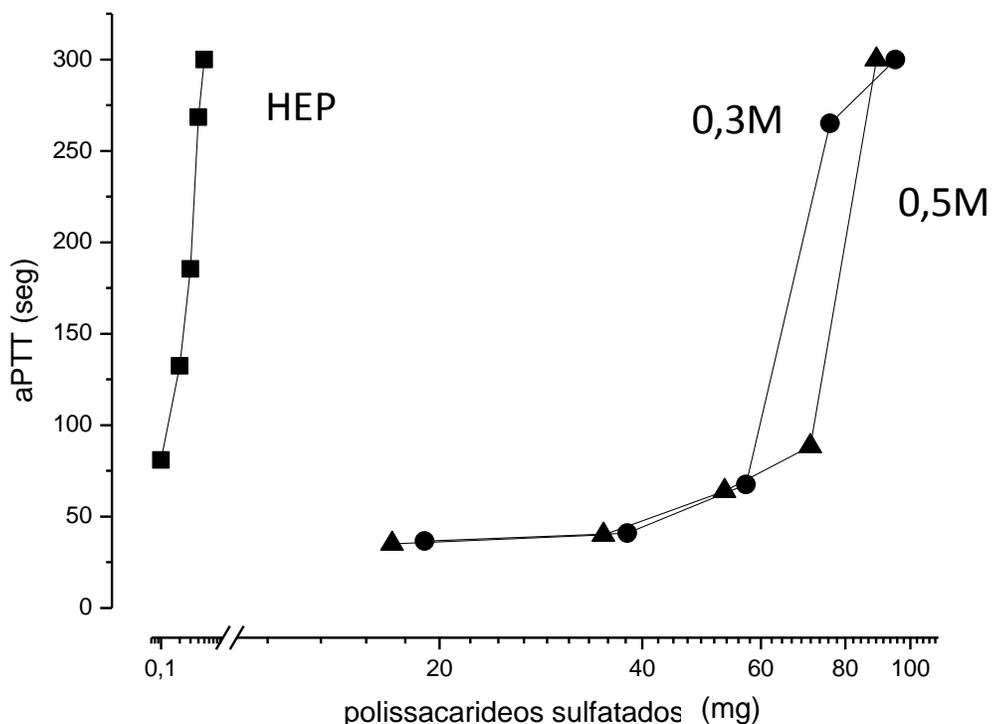


Figura 11: Atividade anticoagulante das frações polissacarídicas 0,3M e 0,5M, obtidas por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) de *G. caudata*, realizados segundo o teste de aPTT.

5.4 Ressonância Magnética Nuclear

Também foi realizado ensaio de ressonância magnética nuclear para caracterização estrutural inicial do polissacarídeo sulfatado presente na fração 0,3M. Como descrito em alguns trabalhos, nos ensaios utilizando ressonância magnética nuclear unidimensional de prótons existe uma região característica, entre 5,5 – 5,0 ppm, onde ressona o próton anomérico. Nesta região, a quantidade de sinais presentes está relacionada com a quantidade de prótons anoméricos de cada unidade de açúcar que compõe a estrutura do polissacarídeo sulfatado. Isso pode ser observado na figura 12,

onde os quatro sinais presentes no espectro de RMN ^1H do polissacarídeo sulfatado de *L. variegatus* corresponde a seu tetrassacarídeo repetitivo.

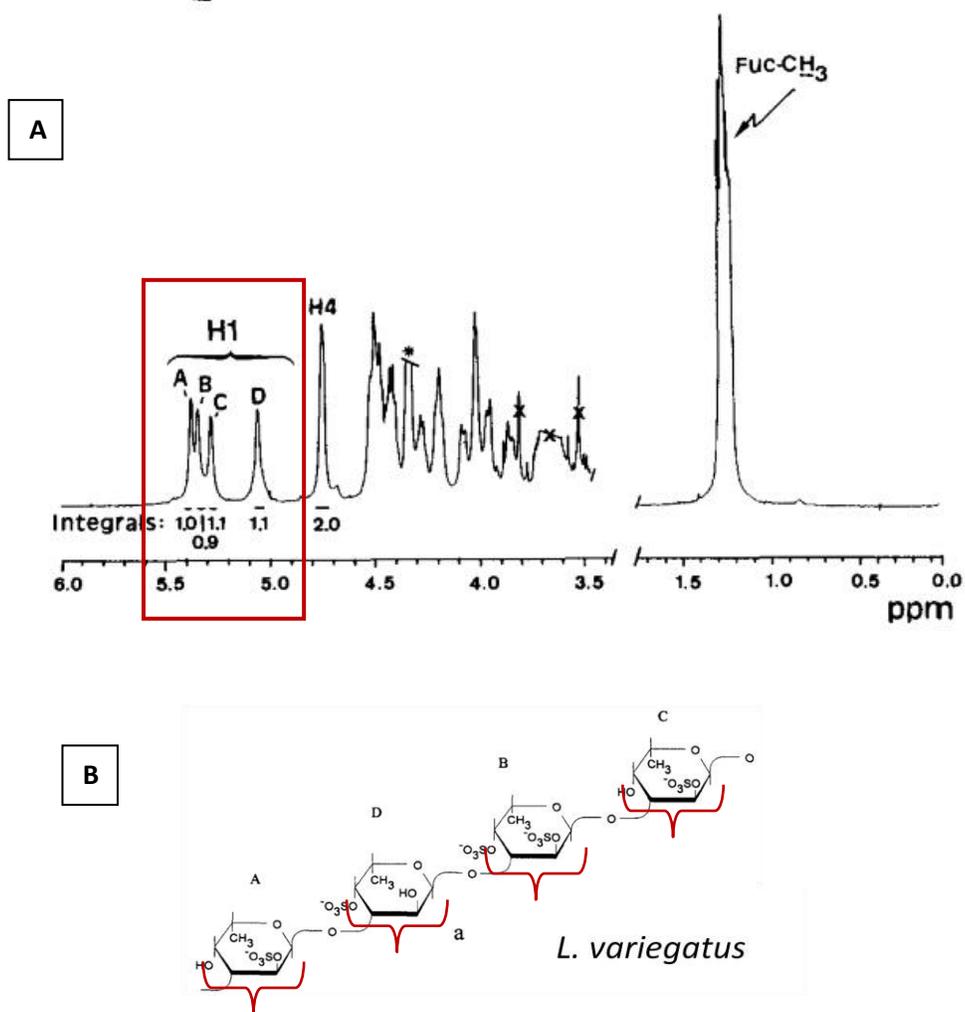


Figura 12: Espectro de RMN ^1H (A) e estrutura do tetrassacarídeo repetitivo (B) extraído de *L. variegatus*. Fonte: Mulloy *et al.*, 1994.

O mesmo é observado no espectro do polissacarídeo sulfatado extraído de *E. lucunter*, onde há presença de um único sinal nessa região, que seria o referente ao monossacarídeo repetitivo que compõe a cadeia do polissacarídeo sulfatado (Figura 13).

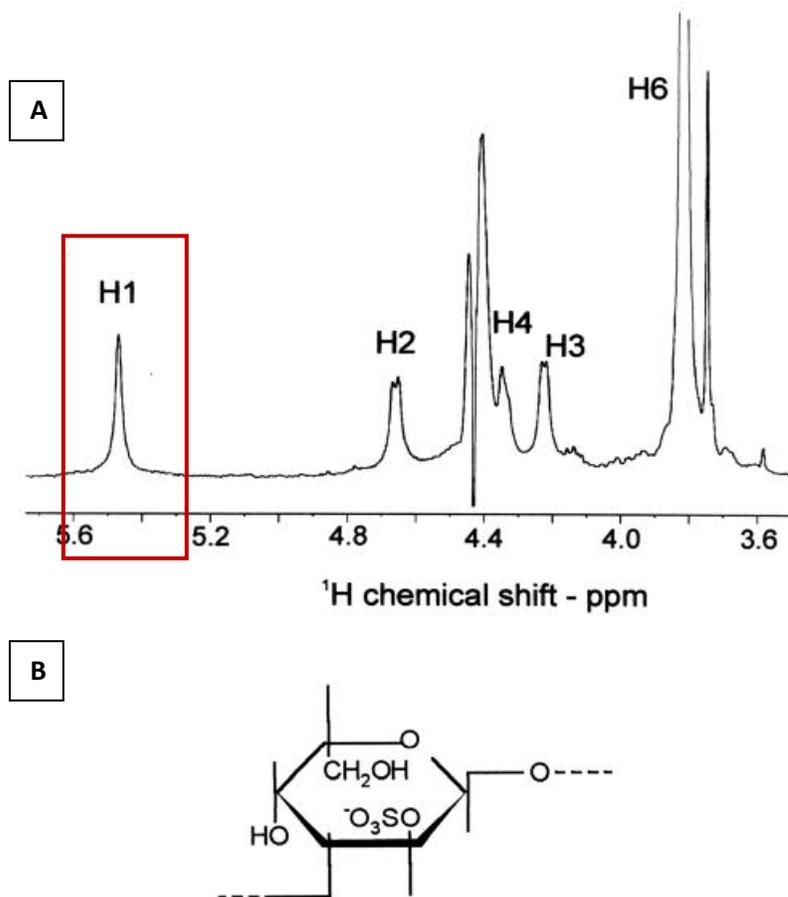


Figura 13: Espectro de RMN ^1H (A) e estrutura do monossacarídeo repetitivo (B) extraído de *E. lucunter*. Fonte: Pereira *et al.*, 2002.

No espectro de RMN ^1H da fração 0,3M, observou-se a presença de um quadrupeto entre 5,0 – 5,5 ppm, região característica do próton anomérico (Figura 14). Esse dado sugere que o polissacarídeo possua em sua estrutura básica quatro monossacarídeos repetitivos. Porém, esse dado preliminar necessita de ensaios complementares como espectros de TOCSY, NOESY e COESY, para elucidação estrutural mais completa.

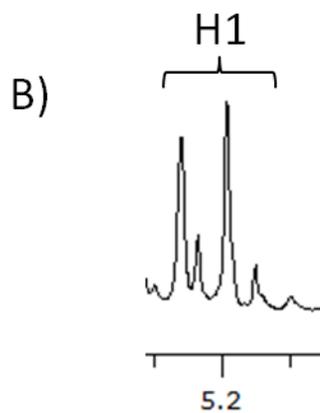
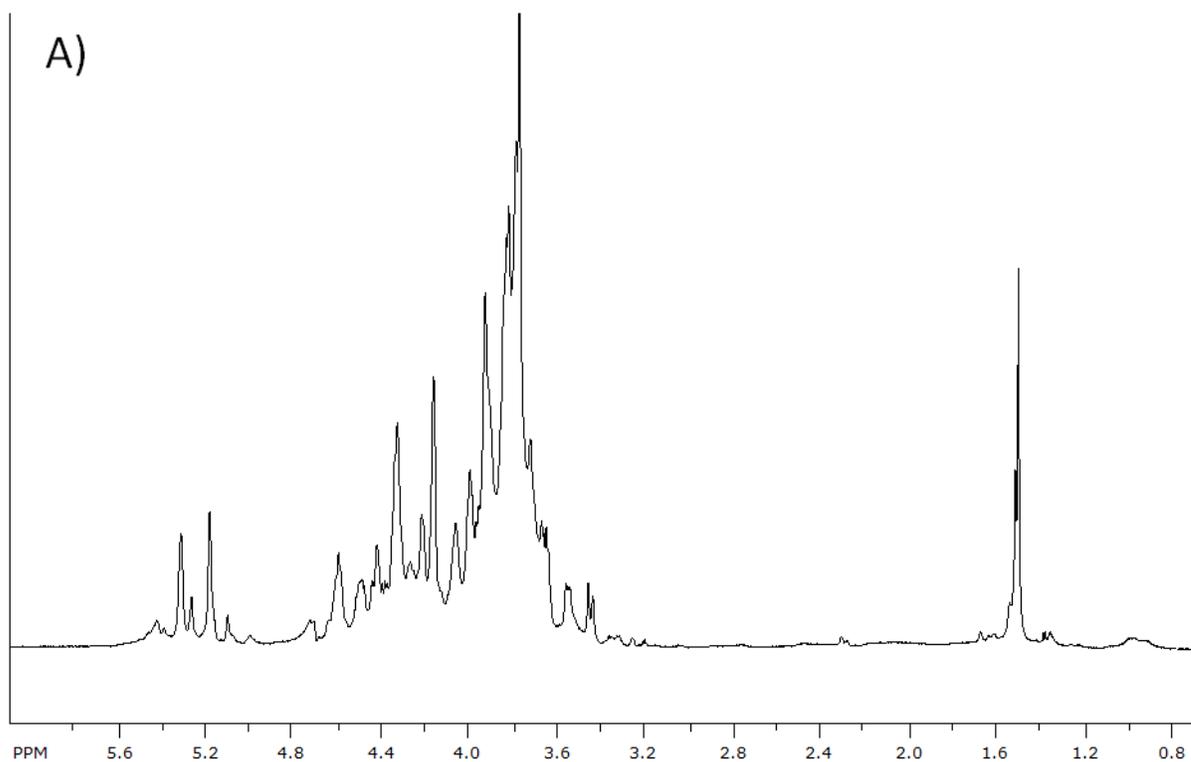


Figura 14: A) Expansão dos espectros unidimensionais (^1H) da Fração 0,3M a 800MHz. O sinal do D_2O foi suprimido por pré-saturação. B) Expansões da região de 5,4 - 5,0ppm– Região característica do próton anomérico.

6. CONCLUSÃO

Os polissacarídeos sulfatados extraídos e isolados da alga marinha *Gracilaria caudata* apresentaram atividade anticoagulante no teste de aPTT,mas ainda não é possível saber através de qual mecanismo eles atuam. Portanto, seria importante fazer a avaliação do potencial farmacológico quanto à atividade anticoagulante desses PS utilizando outros ensaios *in vitro*.

Através da caracterização estrutural preliminar sugere-se que o polissacarídeo sulfatado possua em sua estrutura básica quatro monossacarídeos, que se repetem ao longo da cadeia. Todavia, mais testes se fazem fundamentais para a determinação da sua estrutura química.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, L. O.; BARROWCLIFFE, T. W.; HOLMER, E.; JOHNSON, E. A.; SIMS, G. F. C. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel-filtration. *Thromb Res*, v. 9, p. 575-580, 1976.

ARFORS, K.E.; LEY, K. Sulfated polysaccharides in inflammation. *J Lab Clin Med*. V 121, 1993, p 201-202.

BARROSO, E. M. A.; COSTA, L.S.; MEDEIROS, M. G. L.; CORDEIRO, S.L.; COSTA, M. S. S. P.; FRANCO, C. R.; NADER, H. B.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O.; A non-anticoagulant heterofucan has antitrombotic activity in vivo. *Planta Med*. 2008.

BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, 13, 29R-40R, 2003.

BEZERRA-NETO, J. T. B.; RODRIGUES, J. A. G.; PONTES, G. C.; FARIAS, W. R. L. Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) HOWE: análise de metodologias de precipitação. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v. 3, n. 2, p. 50-62, 2008.

BILAN, M. I.; GRACHEV, A. A.; USTUZHANINA, N. E.; SHASHKOV, A. S.; NIFANTIEV, N. E.; USOV, A. I. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. *Carbohydr Res*, v. 339, p. 511-517, 2004.

BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F.; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C.; FISCHER, A. M.; AGOSTINI, A.; JOZEFONVICZ J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. *Drugs Future*, 20, 1237-1249, 1995.

CARDOZO, K.H.M.; CARVALHO, V.M.; GUARATINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N. et al. Metabolites from algae with economic impact. *Comp Biochem Physiol C – Toxicol Pharmacol.* 2007. P 146.

CHIZHOV AO, DELL A, MORRIS HR, HASLAM SM, MCDOWELL RA, SHASHKOV AS, NIFANT'EV NE, KHATUNTSEVA EA, USOV AI. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Biochemistry Department, Wolfson Laboratories, Imperial College, London, UK. Carbohydr Res.* 1999 Jul 20;320(1-2):108-19.

COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed. Pharmacother.*, v. 64, p. 21–28, 2010.

COSTA, LEANDRO SILVA; ROCHA, HUGO A. OLIVEIRA; Atividades biológicas de Polissacarídeos Sulfatados extraídos da alga vermelha *Gracilaria caudata*. Dissertação de Mestrado; Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências – Departamento de Bioquímica, 2008.

COELHO, T. C.; LARANJEIRA, M. C. M.. Síntese e caracterização de heparina de baixo peso molecular. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, pp 6-12, 2004.

DAMONTE, E. et al. Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Biochem. Pharmacol.*, v.15, n. 47(12), p. 2187-92, 1994.

DIETRICH, C. P.; PAIVA, J. F.; MORAES, C. T.; TAKAHASHI, H. K.; PORCINATTON, M. A.; NADER, H. B. Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant from *Anomalocardia brasiliensis*. *Biochem Acta*, v. 843, p. 1-7, 1985.

ENGELBERG, H. Heparin, non-heparin glycosaminoglycans and heparinoids: an overview of their application in atherosclerosis. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, v. 17, p. 5-8, 1991.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. *J BiolChem*, v. 275, n. 38, p.29299-29307, 2000.

FARIAS, E.H.C.; POMIN, V.H.; VALENTE, A.P.; NADER, H.B.; ROCHA, H.A.O.; MOURAO, P.A.S. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. *Glycobiology* 2008, 18, 250–259.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998; p 267-285.

HAROUN-BOUHEDJA, F.; MOSTAFA, E.; SINQUIN, C; BOISSON-VIDAL, C. Relation Between sulfato groups and biological activities of fucans. *Thromb.Res.* 100, 453-459, 2000.

KATZ, M.E., FINKEL, Z.V. GRZEBYK, D., KNOLL, A . H. & FALKOWSKI, P.G. Evolutionary trajectories and biogeochemical impacts of marine Eukaryotic phytoplankton. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic*, 2004.p 553-556.

KIMURA, J. Activity anticoagulant in polysaccharides sulfated from *Laminarias*. *Hokkaiogabuzaschi*. V 19, n., p. 10, 1941.

LAHAYE, M .Developments on gelling algal galactans, their structure and physicochemistry. *J. Appl. Phycol.*, 13, 173–184, 2001.

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

LOVE, J.; PERCIVAL, E. The polysaccharides of the green seaweed *Codium fragile*. Part II. The water-soluble sulphated polysaccharides. *J. Chem. Soc.* 1964, 3338–3345.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M.L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2001, 28, 395–399.

MELO, F. R.; PEREIRA, M. S.; FOGUEL, D.; AND MOURÃO, P. A. S.. Antithrombin-mediated Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides. Different mechanisms for heparin and sulfated galactans. *The Journal of Biological Chemistry* - Vol. 279, N^o. 20, Issue of May 14, pp. 20824–20835, 2004.

MELO, E.I., PEREIRA, M.S., CUNHA, R.S., LEME, M.P.S., MOURÃO, P.A.S., Heparin quality control in the Brazilian market: implications in the cardiovascular surgery. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* vol.23 n^o.2 São José do Rio Preto Apr./June 2008.

MOURÃO, P. A. S; PEREIRA, M. S. Searching from alternatives to heparin sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends Cardiovasc Med*, v. 9, p. 225-232, 2000.

MOURÃO, P. A. S. Estrutura versus atividade biológica de polissacarídeoossulfatados. In.: XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromolecular, 2004, Niterói. XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromolecular, 2004.

MULLOY B.; RIBEIRO, A.C.; ALVES, A.P.; VIEIRA, R.P.; MOURAO, P.A. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the 0-2 and 0-4 positions. *Journal of Biological Chemistry*. 1994 Sep 2;269(35):22113-23

NISHINO, T.; YAMAUCHI, T.; HORIE, M.; NAGUNO, T.; SUZUKI H. Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA. *Thomb Res*, v. 99, p.623-634, 2000.

OLIVEIRA, E. C. HORTA, P. A.; AMANCIO, C. E.; SANT'ANNA, C. L. Avaliação eações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha,algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro. 2002. Disponível em:<<http://www.bdt.fat.org.br/workshop/costa/algas>>. Acesso em: 13/05/13.

OLIVEIRA, E.C.. Introdução à Biologia Vegetal. 2ª edição. 2003. EDUSP. 267p

PAINTER, T.J., Algal Polysaccharides.In: ASPINALL, G.O. (Ed.) *The Polysaccharides*, Vol. 2, Academic Press, New York. pp 195-285, 1983.

PEREIRA, M. S; MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. Structure and anticoagulant activityof sulfated fucans: Comparison between the regular repetitive and linear fucans fromechinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brownalgae. *J BiolChem*, v. 274, p. 7656–7667, 1999.

PEREIRA, M.S.; MELO F.R., MOURÃO P.A. Is there a correlation between structureand anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiology*. v.12 p. 573–580, 2002.

PEREIRA, M. G.; BENEVIDES N. M; MELO, M. R.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R; MOURÃO, P. A. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? *Carbohydr Res*, v. 340, p. 2015–2023, 2005.

QUILLET, M.C. The chemical composition of Brown algae I. The non esterified sugars. Intern Centre NatlSciparis. V 103, 1961, p 12.

RAY, B. Polysaccharides from *Enteromorpha compressa*: Isolation, purification and structural features. Carbohydr. Polym. 2006, 66, 408–416.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. Protista II: heterocontas e algas verdes. Biologia vegetal. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. P 356-383.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. Biologia Vegetal. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, , 2007. 830pp.

ROCHA, H. A. O.; FARIAS, E. H. C.; BEZERRA, L. C. L. M.; ALBUQUERQUE, I. R.L.; MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; LEITE, E. L. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. Infarma, v. 16, p. 1-2, 2004.

ROCHA, H.A.O.; LEITE, E.L.; MEDEIROS, V.P.; LOPES, C.C; NASCIMNTO, F.D.; TERSARIOL, I.L.S.; NADER, H.B. Natural sulfated polysaccharides as antithrombotic compounds. Structural characteristics and effects on the coagulation cascade. Insights into carbohydrate structure and biological function, 2006.p 19.

SIDDHANTA, A.K., SHANMUGAM, M., MODY, K.H., GOSWAMI, A.M., RAMAVAT, B.K. Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. from the west coast of India: chemical composition and blood anticoagulant activity. Int J BiolMacromol., 1999. P 151- 4.

SILVA, R. O.; SANTOS, G. M.P.; NICOLAU, L. A. D.; LUCETTI, L. T.; SANTANA, A. P. M.; CHAVES, L.S.; BARROS, F. C. N.; FREITAS, A. L. P.; SOUZA, M. H. L. P.; AND MEDEIROS, J. R.. Sulfated-Polysaccharide Fraction from Red Algae *Gracilaria caudata*

Protects Mice Gut Against Ethanol-Induced Damage – Mar. Drugs 2011, 9, 2188-2200; doi:10.3390/md9112188.

SMIT, A.J. Medicinal and Pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. J applPhycol. 2004. P 245-263.

SOUSA, A.S. Galactana Sulfatada da alga marinha vermelha *Gelidium crinale* (TURNER) Lamouroux: respostas na inflamação e nocicepção. Universidade Estadual do ceará. Dissertação. 2010. 92p.

SOEDA, S.; ISHIDA, S.; HONDA, O.; SHIMENO, H.; NAGAMATSU, A. Aminated fucoidan promotes the invasion of 3 LL cells through reconstituted basement membrane: Its possible mechanism of action. Cancer Lett, v. 85, p. 133-138, 1994.

STORTZ, C.A.; CERESO, A.S. Room temperature, low-field ¹³C-n.m.r. spectra of degraded kappa/iota carrageenans. Int. J. Bio. Macromol., 13 (2), 10-4, 1991.

USHAKOVA, N.A.; MOROZEVICH, G.E.; USTYUZHANINA, N.E.; BILAN, M.I.; USOV, A.I.; NIFANTIEV, N.E.; PREOBRAZHENS KAYA, M.E. Anticoagulant activity of fucoidans from brown algae. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 2009, 3, 77–83.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. Food Hydrocol., v.12, p. 301–308, 1998.

VIEIRA, L.A.P. et al. The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 37(7), p. 1071-1079, 2004.

VIDOTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. Química Nova. 2004.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G. E JAHNS, H. M. Algae: An introduction to phycology. Cambridge: Cambridge University Press. 1995. 623p.

YANG, B.; YU, G.; ZHAO, X.; REN, W.; JIAO, G.; FANG, L.; WANG, Y.; DU, G.; TILLER, C.; GIROUARD, G.; BARROW, C.J.; EWART, H.S.; ZHANG, J. Structural characterisation and bioactivities of hybrid carrageenan-like sulphated galactan from red alga *Furcellaria lumbricalis*. Food Chem. 2011, 124 p 50–57.

YOON, S.; PEREIRA, M. S.; PAVÃO, M. S. G.; HWANG, J.; PYUNG, Y.; MOURÃO, P. A. S. The medial plant *Porana Volubiliscotains* polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. Tromb Res, v. 106, p. 51-58, 2002.

WEITZ, J. New anticoagulant strategies. Current status and future potentials. Drugs, v. 48, p. 485-497, 1994.

ZHANG, Q.; LI, N.; ZHOU, G.; LU, X.; XU, Z.; LI, Z. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. Pharmacol Res, v. 48, n. 2, p. 151–155, 2003.