



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CAMPUS MACAÉ

CURSO DE FARMÁCIA



Campus UFRJ-Macaé
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Desenvolvimento de nanossistema composto por quitosana e galactana sulfatada extraída da
alga marinha *Botryocladia occidentalis*

Thamiris Brandão Peixoto Sampaio

Macaé

Julho de 2013

Desenvolvimento de nanossistema composto por quitosana e galactana sulfatada extraída da alga marinha *Botryocladia occidentalis*

Thamiris Brandão Peixoto Sampaio

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

Membros da Banca Examinadora:

.....
Prof.

Professor Adjunto UFRJ Campus Macaé

.....
Prof.

Professor Adjunto UFRJ

.....
Prof.

Professor Adjunto UFRJ Campus Macaé

.....
Prof.

Professor Adjunto UFRJ Campus Macaé

.....
Prof. Leonardo Paes Cinelli

Professor Adjunto UFRJ Campus Macaé

Ficha Catalográfica

Desenvolvimento de nanossistema composto por quitosana e galactana sulfatada extraída da alga marinha *Botryocladia occidentalis*; Orientador Leonardo Paes Cinelli – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé

Xii; 32f.

Monografia Apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, 2013.

- 1- *Botryocladia occidentalis*
- 2- Polissacarídeo sulfatado
- 3- Galactana sulfatada
- 4- Quitosana
- 5- Nanopartículas
- 6- Anticoagulante

I- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé

II-Desenvolvimento de nanossistema composto por quitosana e galactana sulfatada extraída da alga marinha *Botryocladia occidentalis*

Thamiris Brandão Peixoto Sampaio

**Título: Desenvolvimento de nanossistema
composto por quitosana e
galactana sulfatada extraída da alga marinha
*Botryocladia occidentalis***

**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 de 2013

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e a espiritualidade por ter me concedido esta oportunidade de estar concluindo mais uma etapa da minha vida, a graduação. Por ter colocado uma luz no fim do túnel quando eu achava que todas as portas para a pesquisa estavam fechadas e que eu não me interessaria por mais nenhum projeto, mas nunca desistiram de mim, consegui encontrar um projeto que fez com que meus olhos voltassem a brilhar novamente, e um orientador excepcional com o qual eu aprendi e aprendo muito diariamente. Obrigada Deus por todas as oportunidades que o senhor coloca em meu caminho, obrigada por nunca ter deixado que eu desistisse no meio de minha jornada, obrigada por me fazer persistir na área da pesquisa. Obrigada por mais esta vitória! Sei que esta é somente a primeira de muitas que virão.

Leonardo Paes Cinelli: Obrigada por acreditar em mim, pelas orientações, e pela atenção, mesmo nos momentos mais corridos e conturbados você sempre foi um orientador presente. Obrigada por me orientar inclusive nas manhãs de sábado! Posso dizer que eu não poderia ter escolhido melhor orientador, me considero uma aluna muito sortuda. Obrigada por me ensinar um pouco de tudo o que você sabe, não só academicamente, mas também em relação à vida. Se hoje o questionamento passou a me integrar, certamente foi com você que aprendi. Obrigada por tudo! Nos vemos no mestrado.

Cleuda Rebello Brandão Silva: Agradeço a minha amada mãe pela força e incentivo durante todos esses anos, sem o seu amor incondicional, carinho, dedicação, educação, conselhos, eu nada seria. Sem o seu apoio eu nunca teria chegado onde estou prestes a chegar. Obrigada por ter sido uma mãe presente, por ter me entendido e me tranquilizado nas horas mais difíceis ao longo da faculdade. Sou muito feliz por ter uma mãe amiga como você. Obrigada por representar tudo e mais um pouco em minha vida. Te amo.

Carlos da Costa Brandão: Agradeço ao meu querido e amado avô por ter feito parte da minha vida, da minha infância, lamento não ter tido sua presença durante todos esses anos, você não sabe a falta que me faz. Porém, aonde quer que esteja, sei que sempre esteve ao meu lado, e que está feliz por mim, por mais esta vitória. Palavras nunca irão ser capaz de descrever o quanto é grande o meu amor por você.

Vou sempre levar comigo seu sorriso e sabedorias. Lhe agradeço por ter sido um pai maravilhoso para mim. Se hoje sou o que sou foi pela educação que me deste e pelo exemplo de pessoa honesta, humilde e alegre que foste. Nosso amor é além da vida. Dedico esta vitória a você.

“Eu tenho tanto pra lhe falar
Mas com palavras não sei dizer
Como é grande o meu amor por você
E não há nada pra comparar
Para poder lhe explicar
Como é grande o meu amor por você
Nem mesmo o céu, nem as estrelas
Nem mesmo o mar e o infinito
Não é maior que o meu amor, nem mais bonito
Me desespero a procurar
Alguma forma de lhe falar
Como é grande o meu amor por você
Nunca se esqueça nem um segundo
Que eu tenho o amor maior do mundo
Como é grande o meu amor por você”

(Como é grande meu amor por você/ Roberto Carlos)

Deuzedina Rebello Brandão: Vó obrigada por ter estado sempre ao meu lado, me confortando, me orientando, por me dar abrigo durante os períodos de estágios obrigatórios. Obrigada por fazer parte da minha vida e enche-la de amor. Com certeza minha vida faz muito mais sentido com a sua presença. As pessoas costumam dizer e eu posso afirmar que avó realmente é mãe duas vezes. E é por isso que lhe dedico duplamente esta vitória.

Sylvio Carlos Rebello Brandão: Você se foi há cerca de dois meses, sua ausência me deixou uma grande tristeza, e eu ainda não consigo acreditar que te perdi, não sei se por estar recente ou se pelo fato de que eu não quero realmente acreditar, até mesmo porque sei que a morte não é o fim. Não tive a chance de me despedir de você, mas sei que aonde quer que esteja está feliz por mim.

Sei que não poderei mais lhe abraçar, então o mínimo que posso fazer agora em retribuição ao seu carinho e amor de tio é lhe dedicar esta monografia com todo o meu amor. Obrigada por ter feito parte da minha vida!

Paulo Vieira Silva: Muito obrigada por me acompanhar e me incentivar durante toda essa longa caminhada. Obrigada pelos conselhos, pelos ensinamentos, pelas palavras amigas. Sei que durante esses anos a correria foi grande, e o desespero com provas e avaliações foram muitos, espero de alguma maneira estar retribuindo seu carinho e confiança. Sempre serei grata por tudo o que você fez e faz até hoje por mim. É por isso que lhe digo, pai não é quem coloca no mundo e sim quem cria. Obrigada por tudo pai!

Obrigada ao **Prof. Lúcio Mendes** (Lab. TIF da UFRJ campus Fundão) por ter me cedido espaço em seu laboratório para que eu pudesse produzir minhas nanopartículas, obrigada ao **Prof. Luiz Cláudio** e ao **doutorando Valério** (Lab. TIF da UFRJ campus Fundão) por terem me co-orientado. Não me prolongando mais, gostaria de agradecer ainda ao **doutorando Stephan** e **Prof^a. Ana Tovar** (LabTEC) pelos ensinamentos e atenção.

"It's not the load that breaks you down,
It's the way you carry it"

Lena Horne

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”

Albert Einstein

Por fim, obrigada a banca examinadora, por aceitar o meu convite.

Enfim farmacêutica!!!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Adesão e agregação plaquetária	2
FIGURA 2. Reações da coagulação sanguínea	3
FIGURA 3. distribuição das causas de óbito no mundo de acordo com a OMS	4
FIGURA 4. Diversidade estrutural dos polissacarídeos sulfatados	6
FIGURA 5. Estrutura química do GAG heparina	7
FIGURA 6. Estrutura química da galactana sulfatada da <i>Botryocladia occidentalis</i>	9
FIGURA 7. Esquema representativo do efeito duplo (dependente e independente de serpina) da GS proveniente da <i>B. occ</i> no sistema de coagulação	10
FIGURA 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida	12
FIGURA 9. Cromatografia de afinidade por trombina	12
FIGURA 10. Esquema representativo das nanocápsulas e nanoesferas	14
FIGURA 11. Ilustração da estrutura dimérica da QT	15
FIGURA 12. Esquema representativo da técnica de gotejamento utilizada no preparo das NP (nanoesferas de GS e QT)	21
FIGURA 13. Gráfico ilustra a cromatografia por troca iônica	23
FIGURA 14. Eletroforese em gel de agarose	24

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Tabela de aPTT e IC ₅₀	9
--	---

RESUMO

Atualmente uma das principais causas de morte são doenças relacionadas ao sistema cardiovascular, que podem favorecer o desenvolvimento de trombose, doença a qual necessita de terapia anticoagulante. Há cerca de 50 anos a heparina, potente anticoagulante utilizado na clínica, é comercializado com tal atividade farmacológica. Todavia, este composto possui alguns efeitos colaterais, dentre eles: hemorragia e trombocitopenia; sua extração é realizada de bovinos e suínos, encontrando-se em baixas concentrações nesses animais; e existem riscos de contaminação por xenobióticos - príon (“mal da vaca louca”) ou vírus (“gripe suína”). Desta maneira, uma alternativa para se buscar por novos anticoagulantes seria uma fonte de origem vegetal como as algas marinhas, organismos evolutivamente distantes dos humanos, os quais são fontes abundantes de polissacarídeos sulfatados, dentre estes fucanas e galactanas sulfatadas. Relatos científicos mostram que a galactana sulfatada proveniente da alga marinha *Botryocladia occidentalis* possui ação anticoagulante via antitrombina tão potente quanto à da heparina. Com base nisto se tem por objetivo desenvolver um sistema nanoparticulado composto por quitosana e galactana sulfatada oriunda da *B. occidentalis* que mantenha sua atividade anticoagulante e ofereça vantagens intrínsecas de nanossistemas. Como resultado se obteve uma nanoformulação, a qual espera-se possuir menos riscos de efeitos colaterais comparado a heparina, e que principalmente, mantenha sua ação anticoagulante.

LISTA DE ABREVIACÕES

AT - Antitrombina

B. occ - *Botryocladia occidentalis*

CETAVLON - Brometo de cetiltrimetilamnio

DMB - azul de dimetilmetileno – do inglês *dimethyl methylene blue*

GAG - Glicosaminoglicano

GS -Galactana sulfatada

HCII - Cofator II de heparina

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

Np - Nanoprticula(s)

CS - Condroitim sulfato

FC - Fucoidan

OMS – Organizao mundial de saúde

PS - Polissacarídeos sulfatados

QT - Quitosana

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES

1	Introdução.....	1
1.1	Hemostasia, coagulação sanguínea e trombose.....	1
1.2	Polissacarídeos sulfatados.....	6
1.3	Heparina como anticoagulante.....	7
1.4	Galactana sulfatada proveniente da <i>Botryocladia occidentalis</i>	8
1.5	Ao anticoagulante da galactana versus a heparina.....	11
1.6	Sistemas nanométricos	13
1.7	Nanoprticulas poliméricas.....	14
1.8	Sistemas nanoparticulados de quitosana e galactana sulfatada.....	15
2	Objetivos.....	16
2.1	Objetivos gerais.....	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	Justificativa	17
4	Materiais e métodos.....	19
4.1	Método de extração de polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas.....	19
4.2	Purificação de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.....	20
4.3	Identificação dos polissacarídeos sulfatados por eletroforese em gel de agarose.....	20
4.4	Preparo de nanoprticulas polissacarídicas.....	21
4.5	Determinação de diâmetro médio de partícula.....	22
5	Resultados e discussão.....	23
5.1	Extração e purificação da galactana sulfatada proveniente da alga <i>Botryocladia occidentalis</i>	23
5.2	Preparo de nanoprticulas polissacarídicas.....	25
5.3	Determinação de diâmetro médio de partículas.....	26
6	Conclusão	27
7	Perspectivas.....	28
8	Referências bibliográficas.....	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hemostasia, Coagulação sanguínea e Trombose

O sistema cardiovascular é responsável por desempenhar inúmeras funções vitais, tais como o transporte de oxigênio e nutrientes às células teciduais; transporte de hormônios a tecidos alvo; remoção de metabólitos para via de excreção; e manutenção do sistema imunológico.

Plaquetas, fatores de coagulação, inibidores da coagulação, componentes do sistema fibrinolítico e vasos sanguíneos são responsáveis pelo processo de hemostase. Para um sistema cardiovascular saudável, é necessário que se tenha uma hemostasia, equilíbrio responsável por manter a fluidez do sangue nos vasos sanguíneos, onde mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes se contrabalanceiam, impedindo tanto a trombose quanto a hemorragia, de maneira que o sangue seja fluido, livre de coágulos para que possa circular sem obstáculos nos vasos sanguíneos. E em caso de lesão vascular, este sistema fisiológico deve ser capaz de interferir de maneira rápida e eficiente a fim de estancar o sangue, promovendo a interrupção do sangramento, entretanto evitando a formação exacerbada de coágulos extensos, e após o reparo do dano, deve promover a ativação do sistema de fibrinólise para que a fluidez do sangue possa ser restaurada (Hoffbrand e Moss, 2008).

A coagulação sanguínea pode ser descrita como um sistema fisiológico complexo e sofisticado, o qual engloba um sistema biológico que desencadeia através de proteólise uma cascata de fatores enzimáticos da coagulação (série de reações de ativação de zimogênios), os quais culminam na conversão de protrombina (fator II) em trombina (fator IIa, protease final gerada), onde esta última não só promove a clivagem de fibrinogênio solúvel no plasma, em fibrina, mas também auxilia na amplificação do mecanismo de coagulação pela ativação de alguns fatores plasmáticos como os fatores V, VIII, XI, agindo como potente agonista da ativação plaquetária.

A fibrina por sua vez, é responsável por induzir a infiltração das plaquetas agregadas no local da lesão, convertendo o tampão hemostático primário em tampão hemostático estável (Hoffbrand e Moss, 2008).

A exposição de colágeno e liberação do Fator de Von Willebrand induzido pela lesão vascular, provenientes do subendotélio, se ligam à glicoproteína Ia/IIa e Ib, glicoproteínas presentes na membrana plaquetária, ocorrendo assim a adesão das plaquetas ao subendotélio (Goodman & Gilman, 2010). Quando o Fator de Von Willebrand se liga a glicoproteína Ib ocorre a ativação plaquetária (**Fig 1**), onde a plaqueta tem o seu formato modificado, expandindo sua superfície de contato (emissão de pseudópodos) por onde ocorre a formação de frestas, que são importantes para que os grânulos do interior da plaqueta cheguem a superfície luminal, através dos canalículos formados por estas projeções. Simultaneamente, as plaquetas começam a expressar glicoproteína IIb/IIIa que é importante para a agregação plaquetária. A glicoproteína IIb/IIIa interage com o fibrinogênio, o qual interage com outra glicoproteína IIb/IIIa de outra plaqueta, e assim gera interações plaqueta-plaqueta (agregação plaquetária) (**Fig 1**), formando o tampão plaquetário primário.

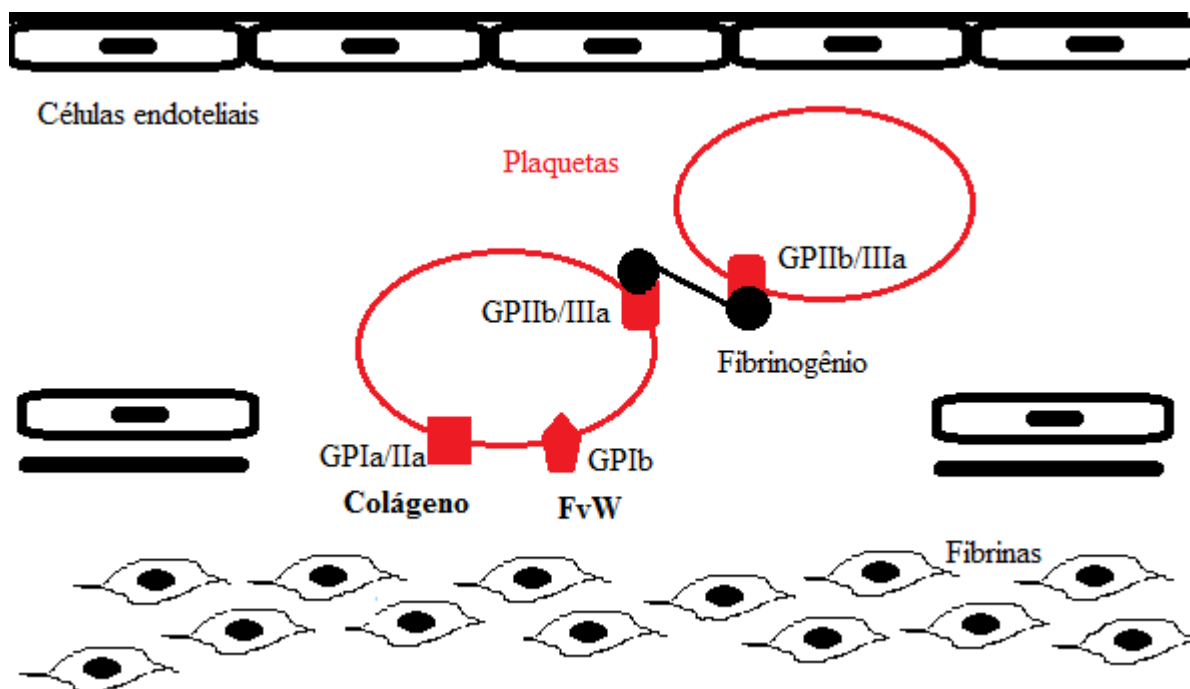


Fig 1. Adesão e Agregação plaquetária. A figura ilustra a ligação do colágeno e do Fator de Von Willebrand as glicoproteínas Ia/IIa e Ib gerando a adesão plaquetária ao subendotélio de um vaso sanguíneo lesionado. E a ligação do fibrinogênio as glicoproteínas IIb/IIIa levando a agregação e secreção plaquetária. Figura adaptada de Goodman & Gilman, 2010.

Posteriormente à adesão e agregação plaquetária ocorre a ativação dos fatores de coagulação (tanto o da via extrínseca, VII, quanto os da via intrínseca, IX e VIII, e os da via comum X, V e II), onde a coagulação sanguínea se inicia com a exposição do subendotélio ocasionada por uma injúria, por exemplo, onde uma glicoproteína denominada de fator tissular, a qual se encontra ligada a células não endoteliais entra em contato com o sangue e se liga ao fator VII ativado (VIIa), e este complexo por sua vez ativa os fatores IX e X (Fig 2).

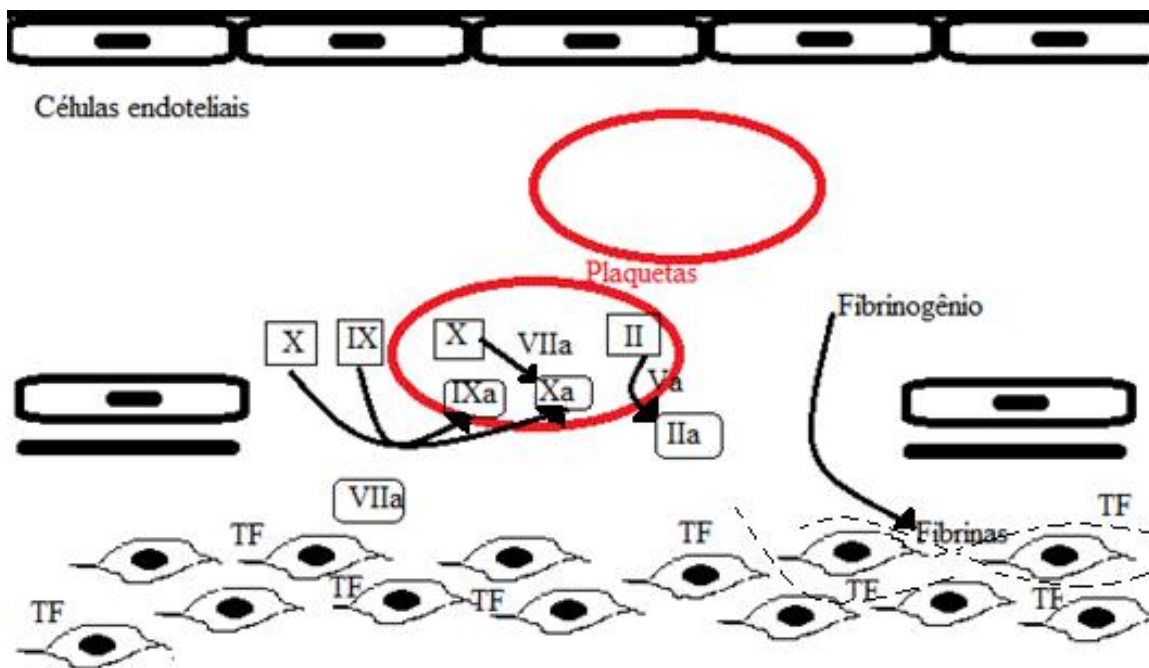


Fig 2. Reações da coagulação sanguínea. A figura ilustra as vias extrínseca (fator tecidual e fator VII), intrínseca (fatores IX e VIII) e comum (X, V e II). TF representa o Fator Tecidual; nos quadrados em algarismo romano se encontram os zimogênios do fator de coagulação, e nos quadrados ovais se encontram as proteases ativas; os fatores ativados são representados pela letra “a”; a protrombina é representada por II e a trombina por IIa. Figura adaptada de Goodman & Gilman, 2010.

A ativação do fator X é feita então pelo fator IXa acelerado pelo fator VIII, onde consequentemente o fator Xa converte a protrombina em trombina, numa reação acelerada pelo fator Va. E por fim, a trombina realiza a clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina, os quais sofrem uma reação de polimerização e culminam em um coágulo estável (tampão secundário estável), interrompendo assim o extravasamento de sangue caso haja algum tipo de lesão vascular (Chaves *et al.*, 2010).

Em uma segunda fase, ocorre uma amplificação envolvendo os fatores ativados V, VIII, IX, e XI através da pequena quantidade de trombina gerada na fase anteriormente descrita (fase de iniciação), resultando em mais fator Xa e conseqüentemente em trombina. Onde as principais proteínas plasmáticas que modulam o mecanismo anticoagulante são a antitrombina (AT), a qual inativa os fatores Xa e IXa; e o cofator II de heparina (HCII), o qual inativa a trombina.

A incidência de doenças e acidentes cardiovasculares tem aumentado o número de óbitos desde 1990. Estima-se que cerca de 30% dos óbitos são ocasionados por doenças cardiovasculares (**Fig 3**). Segundo a OMS, as doenças cardiovasculares são as principais causas de óbitos tanto nos países desenvolvidos quanto nos subdesenvolvidos. Um em cada três pacientes com tromboembolismo manifestam embolia pulmonar, sendo 12% representativo do número de morte ocasionada em um mês após o diagnóstico, portanto muito precocemente. A embolia pulmonar assim como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, e trombose venosa profunda representam sérias conseqüências das doenças tromboembólicas (Chaves *et al.*, 2010).

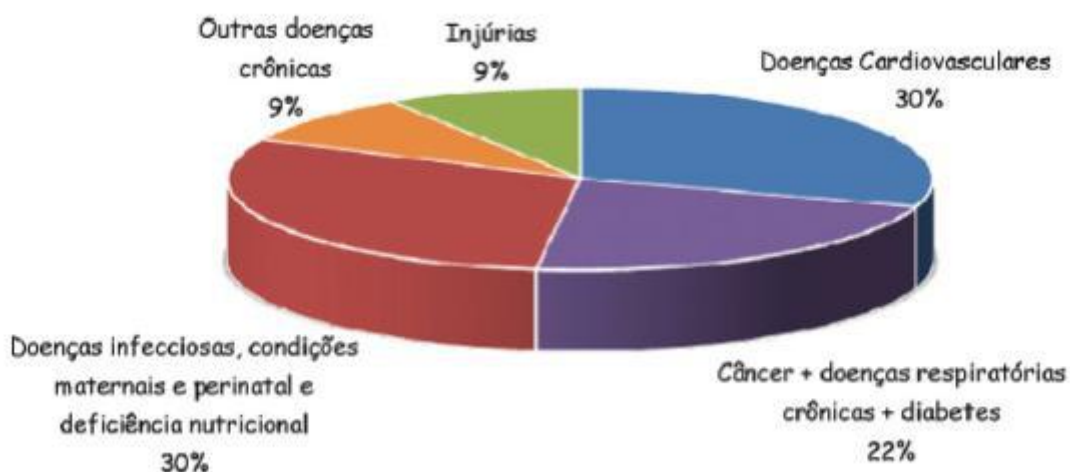


Fig 3. Distribuição das causas de óbito no mundo de acordo com a OMS. Retirada de (Chaves *et al.*, 2010).

A hipercoagulabilidade sanguínea, a qual é uma das características da tríade de Virchow, junto à lesão endotelial e lentificação do fluxo sanguíneo (estase), sugere a fisiopatologia de trombose, coagulopatia a qual é caracterizada pela formação de um coágulo (constituído por um agregado de plaquetas e/ou coágulo de fibrina) no interior dos vasos sanguíneos.

Logo a trombose se caracteriza pela formação de um tampão hemostático no interior do vaso sanguíneo, na ausência de lesão que levaria ao sangramento (Hoffbrand e Moss, 2008). Estes processos tromboembólicos podem estar relacionados a alterações na coagulação sanguínea, lesão na parede de vasos, modificação no conteúdo de leucócitos, plaquetas circulantes e estases. No entanto, cada tipo de trombose pode estar associado a um agente indutor diferente, ou a uma combinação dos mesmos (Rosenberg e Aird, 1999).

Com isso, a trombose pode gerar danos locais como, por exemplo, a isquemia, e danos mais distanciados como a embolia, podendo assim comprometer diversas regiões do corpo humano, onde no sistema cardiovascular pode levar a um infarto do miocárdio; e no sistema vascular de um modo geral pode levar a doenças arteriais periféricas e oclusão venosa profunda (Chaves *et al.*, 2010).

Existem dois tipos de trombose, a arterial e venosa. A trombose arterial pode ocasionar uma necrose isquêmica do tecido suprido por tal artéria. Na trombose arterial êmbolos de plaquetas e fibrinas podem se soltar do tampão primário e obstruir artérias a longa distância, um exemplo seria o trombo da artéria carótida obstruindo uma artéria cerebral (Hoffbrand e Moss, 2008). Já na trombose venosa, tecidos os quais são irrigados por determinada veia tornam-se edematosos e inflamados. Um exemplo de complicação grave resultante de trombose venosa seria a embolia pulmonar (Goodman e Gilman, 2005).

1.2 Polissacarídeos Sulfatados

Polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas altamente polianiónicas, as quais são encontradas em muitos tecidos animais e vegetais (algas marinhas), onde nos vertebrados ocorrem sob forma da família de GAGs, e nos invertebrados podem ser divididos em duas famílias principais, a de homopolissacarídeos (fucanas sulfatadas e galactanas sulfatadas), e de heteropolissacarídeos podendo ainda variar quanto sua ligação glicosídica sendo α ou β , tamanho da cadeia e grau de ramificação (**Fig 4**) (Matthews, 1975).

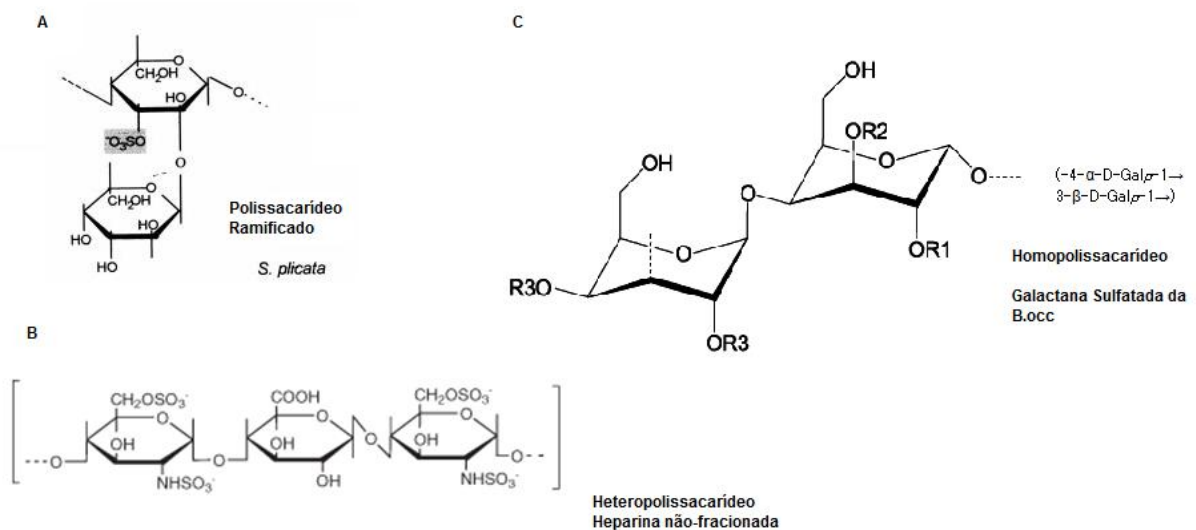


Fig 4. Diversidade estrutural dos polissacarídeos sulfatados. A) Polissacarídeo ramificado da *Styela plicata*. B) Heteropolissacarídeo heparina não-fracionada. C) Homopolissacarídeo da galactana sulfatada da *Botryocladia occidentalis* com ligação glicosídica α e β . Adaptado de Farias et al., 2000; Chaves et al., 2010; e Melo et al., 2008.

De modo geral, atualmente são realizados estudos de prospecção de PS de algas marinhas com fins farmacotecnológicos, buscando por este tipo de macromoléculas em algas economicamente cultiváveis, que apresentem boa disponibilidade na natureza, possuindo alto rendimento de PS, interação com diversas proteínas e que possua intervenções em patologias.

Os PS apresentam as mais diversas ações farmacológicas, dentre estas, anti-inflamatórias (Hwang *et al.*, 2011), imunomodulatória (Karnjanapratum *et al.*, 2011), modulação da atividade de proteases (Hlawaty *et al.*, 2011), indução de apoptose (Jin *et al.*, 2010), antioxidante (Hu *et al.*, 2010), antiviral/antirretroviral (Makarenkova *et al.*, 2009), revascularização (Trincherro *et al.*, 2009), antiangiogênica (Luyt *et al.*, 2003), antitumoral e anticoagulante (Koyanagi *et al.*, 2003) (atividade biológica mais explorada em polissacarídeos sulfatados e também no presente trabalho).

1.3 Heparina como anticoagulante

A heparina (**Fig 5**) é um glicosaminoglicano (GAG), ou seja, é constituída por uma cadeia polissacarídica não ramificada, composta por unidades dissacarídicas repetitivas, que por sua vez são formadas por unidades de ácido urônico e Glucosamina (Yanagishita, 1993).

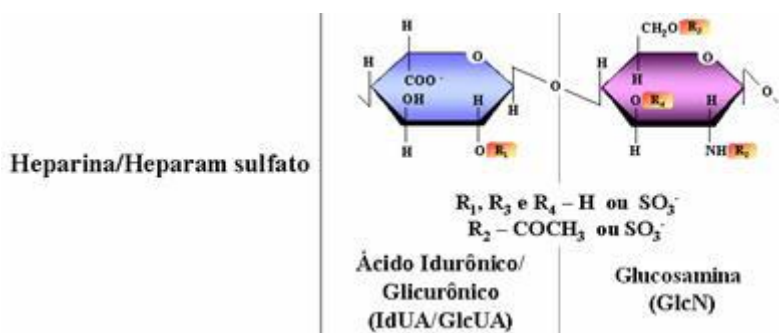


Fig 5. Estrutura química do GAG Heparina. Unidade dissacarídica repetitiva constituinte da Heparina, Ácido idurônico ou Glucurônico e Glucosamina (Yanagishita, 1993).

A heparina não-fracionada é um potente agente anticoagulante extraído do intestino de suínos e pulmão de bovinos utilizado clinicamente há mais de 50 anos. Seu principal mecanismo anticoagulante consiste em acelerar, em cerca de 2.000 vezes a velocidade com que a antitrombina (AT) e o HCII neutralizam as atividades das serinoproteases da cascata da coagulação sangüínea. Desta maneira a AT inibe todas as proteases da via intrínseca, dentre elas a trombina (IIa) e a forma ativa do fator X, enquanto que o HCII inibe somente a trombina.

Em relação à estrutura e atividade da heparina, sua sequência pentassacarídica específica e seu padrão de sulfatação são cruciais para que a AT possa ser ativada conformacionalmente (Melo FR *et al.*, 2004).

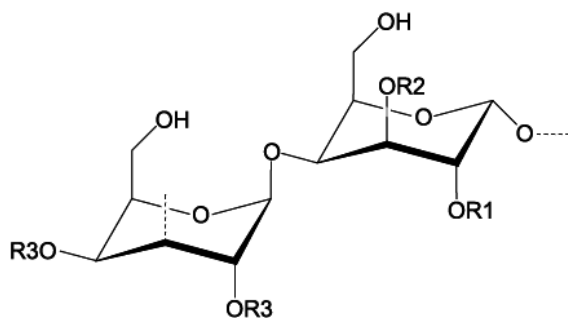
Todavia, a heparina possui desvantagens como indução de hemorragia; desenvolvimento de trombocitopenia; deficiência de antitrombina; e incapacidade de inibir a trombina ligada fibrina. Além disso, suas fontes de origem animal, intestino de suínos e pulmão de bovinos, dispõem de baixas concentrações deste GAG. Não se pode ainda, descartar a possibilidade de contaminações por xenobióticos seja por príons, proteínas modificadas causadoras de doenças neurodegenerativas, (“mal da vaca louca”), ou por vírus (“gripe suína”) (Melo FR *et al.*, 2004).

1.4 Galactana sulfatada proveniente da *Botryocladia occidentalis*

As galactanas sulfatadas (GS) são polissacarídeos sulfatados altamente aniônicos compostos exclusivamente por galactose. Este tipo de polissacarídeo pode ser encontrado em algas marinhas tais como *Gelidium crinale* e *Botryocladia occidentalis*, e em invertebrados como *E. lucunter*, *H. monus*, e *S. franciscanus* (Melo FR *et al.*, 2004), porém seu padrão de sulfatação é o diferencial entre essas GS de diferentes organismos marinhos.

Além disso, a estrutura química das GS podem sofrer variações de acordo com a espécie (Percival e Ross, 1950; Mian e Percival, 1973), influenciando conseqüentemente nas respectivas atividades biológicas, anticoagulante e antitrombótica e tantas outras passíveis de estudo. Assim como a espécie, o procedimento de extração (Mabeau *et al.*, 1990), a época do ano e o clima são outras condições influenciáveis.

A GS da alga marinha *Botryocladia occidentalis* possui em sua estrutura química unidades repetitivas $-4-\alpha\text{-D-Galp-1}\rightarrow 3-\beta\text{-D-Galp-1}\rightarrow$, com padrão de sulfatação variável (**Fig 6**), onde um terço das suas unidades estão 2,3-di-O-sulfatada e o outro um terço está 2-O-sulfatada (Melo et al., 2008).



R1, R2 and R3 = H or SO₃⁻
R1 as SO₃⁻ ≥ 66 %
R2 as SO₃⁻ ≥ 33 %

Fig 6. Estrutura Química da Galactana Sulfatada da *Botryocladia Occidentalis*. Ilustra as unidades dissacarídicas repetitivas compostas por $-4-\alpha\text{-D-Galp-1}\rightarrow 3-\beta\text{-D-Galp-1}\rightarrow$, com padrão de sulfatação variável, sendo um terço das unidades 2,3-di-O-sulfatada e o outro um terço 2-O-sulfatada. Retirada de (Melo *et al.*, 2008).

Essa GS da *Botryocladia occidentalis* é provida de significativa atividade anticoagulante, sendo esta comparável e muito próxima à atividade da heparina não-fractionada (**tabela 1**), possuindo os menores valores de IC₅₀, e melhor atividade biológica quando comparada a demais GS extraídas de outras fontes e outros polissacarídeos sulfatados como por exemplo fucana sulfatada da *S. franciscanus* e o dermatan sulfato, segundo o teste biológico de aPTT (**tabela 1**). E além disso, a GS possui ação antitrombótica.

Propriedade Anticoagulante de galactanas sulfatadas e fucana sulfatadas						
Polissacarídeos	Fonte	Sulfato/Monossacarídeo	APTT	IC ₅₀		
				Trombina/antitrombina	Trombina/Cofator II de heparina	Fator Xa/antitrombina
		mol/mol	IU/mg		µg/ml	
Galactana sulfatada	<i>B. occidentalis</i>	1.5	130 ± 10	0.06 (±0.01)	0.03 (± 0.01)	0.10 (± 0.03)
	<i>E. lucunter</i>	1.0	20 ± 5	3 (± 0.08)	6 (± 0.09)	20 (± 5)
	<i>H. monus</i>	1.0	~2	> 500	> 500	> 500
Fucana sulfatada	<i>S. franciscanus</i>	1.0	~2	>500	> 500	250
Heparina		1.3	193	0.01 (± 0.01)	0.5 (± 0.10)	0.04 (± 0.02)
Dermatam sulfato		0.5	4	> 500	0.7 (± 0.2)	> 500

Tabela 1. Tabela de aPTT e IC₅₀. Adaptada de Melo FR *et al.*, 2004, da GS proveniente da *B. occ* e demais galactanas de outras fontes, assim como também apresenta os mesmos dados para a heparina (padrão), dermatan sulfato e fucana sulfatada.

A GS age através de dois mecanismos de ação, dependente de serpina e independente de serpina (**Fig 7**). Onde através deste último mecanismo (independente), a GS é capaz de se ligar diretamente as serpinas AT e HCII, ocorrendo a inibição do complexo “tenase” intrínseco e do complexo “protrombinase”, inibindo conseqüentemente o IIa e o fator Xa,.

Já em relação ao mecanismo dependente de serpinas, a GS pode se ligar tanto a AT ou ao HCII, onde estas serpinas por sua vez possuem seu efeito inibidor sobre as proteases IIa e Xa potencializado (Melo *et al.*, 2008). Com tudo, predomina-se o efeito independente de serpina.

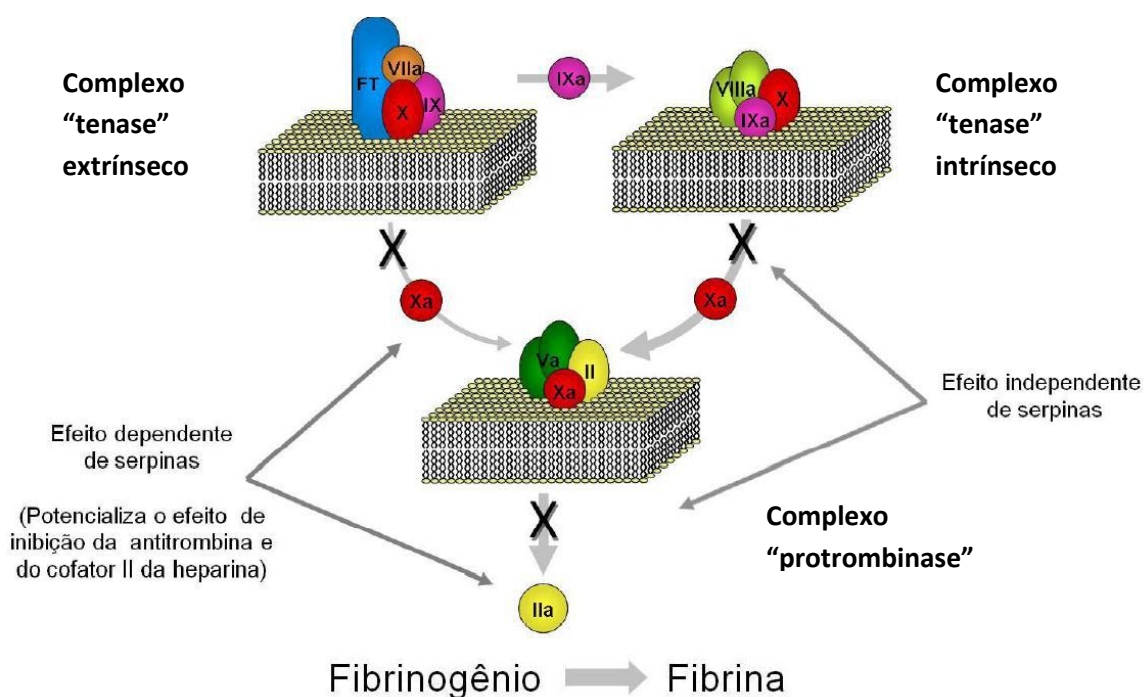


Fig 7. Esquema representativo do efeito duplo (dependente e independente de serpina) da GS proveniente da *B. occ* no sistema de coagulação. Esquema adaptado de Glauser *et al.*, 2009.

De maneira geral este PS promove a inibição do complexo “tenase” intrínseco, o qual se faz necessário para a formação do fator Xa; e do complexo “protrombinase”, o qual é crítico para a formação de trombina (Glauser *et al.*, 2009).

Além disso, a GS em baixas doses possui ação antitrombótica, estando associada à ação anticoagulante. Desta forma, a GS possui um efeito duplo, onde em doses baixas inibe as proteases da cascata de coagulação, e em doses altas predomina a ativação do fator XII, proporcionando um efeito pró-coagulante (Melo *et al.*, 2008).

1.5 Ação anticoagulante da Galactana versus a Heparina

A heparina e a GS são PS os quais possuem ação anticoagulante, ambos inibem a trombina e o fator Xa. Porém, existem algumas diferenças entre estes PS, como por exemplo, no peso molecular, estrutura, afinidade por trombina e AT, e mecanismos de ação. A heparina não-fracionada possui dois mecanismos distintos, um deles é a ativação conformacional da AT, e o outro é a formação de um complexo ternário (AT, protease, e heparina), onde a protease pode ser a trombina ou o fator Xa (Melo FR *et al.*, 2004), porém para isto é necessária a presença de uma sequência pentassacarídica específica para induzir a ativação conformacional da AT (Melo FR *et al.*, 2004), a qual já é suficiente para acelerar a inibição do fator Xa (Streusand *et al.*, 1995). A inibição da trombina também pode ser mediada pelo HCII, mecanismo pelo qual não se faz necessária uma sequência específica na molécula de heparina (Tollesfsen, 1994). No entanto cadeias de heparina maiores do que vinte resíduos são importantes para a catálise da reação (Liaw *et al.*, 1999).

A GS além de ação anticoagulante, também apresenta atividade antitrombótica. Este PS, foi descoberto através de uma pesquisa realizada por Farias e colaboradores (2001), onde foi feito um “screening” inicial, com foco nos PS provenientes de diversas espécies de algas marinhas. No entanto, um dos resultados mais expressivos foi o da *B. occ* (Farias *et al.*, 2000), onde a partir desta evidencia buscaram identificar os requisitos estruturais responsáveis por conferir atividade anticoagulante ao PS desta alga. Seu mecanismo de ação como descrito anteriormente, é semelhante ao da heparina (dependente de serpina), porém difere da mesma em relação a um segundo mecanismo de ação, o independente de serpina. Já em relação ao peso molecular necessário para desempenhar ação anticoagulante, a GS necessita de uma cadeia significativamente maior quando comparada à heparina, de aproximadamente 45kDa (**Fig 8**) (Melo FR *et al.*, 2004).

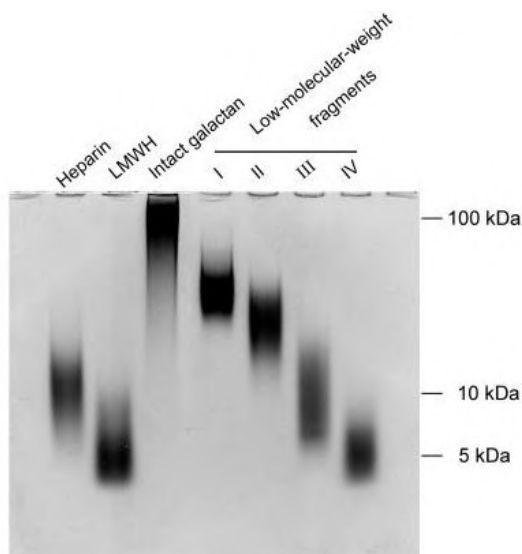


Fig 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Figura mostra o peso molecular da Heparina (aproximadamente 15kDa); heparina de baixo peso molecular; Galactana sulfatada intacta; e quatro diferentes fragmentos de baixo peso molecular da GS (I;II;III;IV). (Melo FR *et al.*, 2004).

Outro fator que diferencia a heparina da GS seria sua afinidade pela AT e IIa, onde a heparina possui maior afinidade pela AT, e já a GS pela IIa (**Fig 9**).

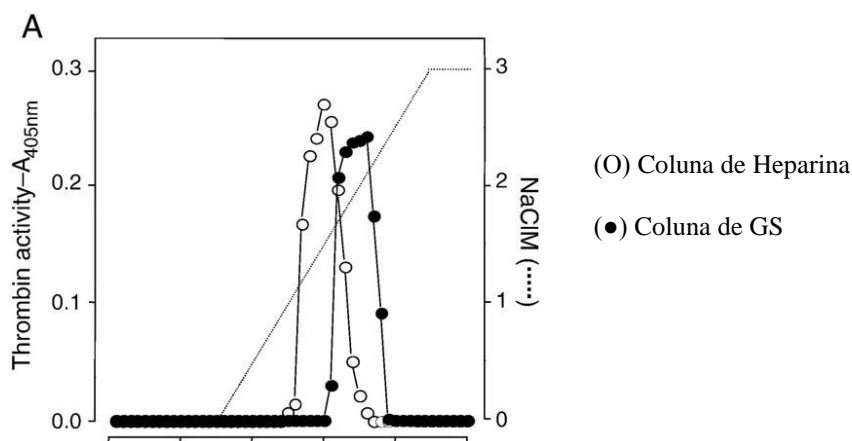


Fig 9. Cromatografia de afinidade por trombina. A) O gráfico representa a cromatografia realizada em duas diferentes colunas. Onde em um primeiro momento realizou-se em coluna de Heparina (O) e em um segundo momento em uma coluna de GS (●). Pode-se observar que a trombina eluiu primeiro na coluna de Heparina, apresentando assim uma menor afinidade por esta, ao contrário de sua afinidade pela GS, onde a trombina elui em tempo posterior. A linha crescente é representada pelo gradiente crescente de NaCl. Retirado de Melo FR *et al.*, 2008.

1.6 Sistemas nanométricos

Sistemas nanométricos são aqueles que possuem seu tamanho na escala do nanômetro. A nanotecnologia é um campo vasto multidisciplinar, o qual ultimamente tem demonstrado constante crescimento. Sua aplicação está inserida em inúmeras áreas como por exemplo, nanosistemas, nanomateriais e nanodispositivos (Koo *et al.*, 2005). Estes também podem ser definidos como sistemas carreadores de fármacos, quando aplicados na área farmacêutica. Existem diversos tipos de sistemas nanométricos, dentre eles lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas (Ströher *et al.*, 2010).

Estes sistemas constituem uma alternativa, a qual tem por objetivo direcionar o fármaco a seu sítio de ação, conseqüentemente evitando possíveis efeitos adversos (Pinto- Alphanary *et al.*, 2000) e desta maneira, podem desempenhar um papel promissor para diversas terapias, como a anticoagulante, através de nanossistemas de liberação modificada de moléculas bioativas (Koo *et al.*, 2005).

Estes sistemas possuem diversas vantagens tanto terapêuticas quanto farmacotécnicas, dentre estas estão, a possibilidade de aumentar a biodisponibilidade de determinado fármaco por determinada via de administração, reduzir a frequência com que o medicamento será administrado conseqüentemente estimulando a adesão do paciente ao tratamento, redução das doses e conseqüente diminuição das chances de uma possível toxicidade, aumento da seletividade (implicando na redução dos efeitos adversos), aumentando a estabilidade de certos fármacos frente a degradação no trato gastrintestinal (exemplo: proteínas, peptídeos e glicídeos), e possibilitando a administração parenteral de fármacos hidrofóbicos através do aumento de sua solubilidade em água (Koo *et al.*, 2005; Guterres *et al.*, 2003).

1.7 Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas poliméricas (Np), são sistemas carreadores de fármacos, os quais se encontram na escala nano (inferior a $1\mu\text{m}$), sendo estes constituídos por polímeros, sejam eles, naturais ou sintéticos (Guterres *et al.*, 2003).

Levando em consideração o termo “nanopartícula”, este inclui a classificação das Np como nanoesferas ou nanocápsulas. Estas diferem uma da outra devido suas respectivas organizações e composição. As nanocápsulas dispõem de um núcleo oleoso envolto por um polímero, sendo esta definida como oca, e podendo o fármaco estar dissolvido no núcleo oleoso (**Fig 10. a**) ou estar adsorvido a parede polimérica (**Fig 10. b**). Já as nanoesferas, diferentemente das nanocápsulas, são constituídas por uma matriz polimérica, onde o fármaco em questão pode ser encontrado retido (**Fig 10. c**) ou adsorvido (disperso) (**Fig 10. d**) na matriz (Guterres *et al.*, 2003; Mohanraj *et al.*, 2006).

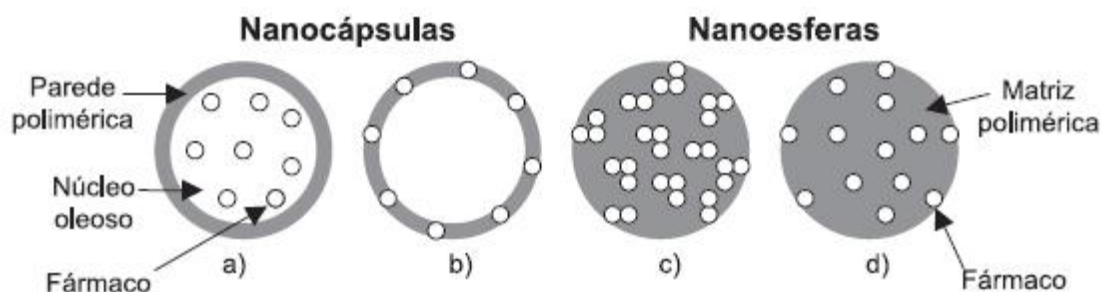


Fig 10. Esquema representativo das nanocápsulas e nanoesferas. Onde, **a)** Fármaco dissolvido no núcleo oleoso da nanocápsula; **b)** Fármaco adsorvido na parede polimérica da nanocápsula; **c)** Fármaco retido na matriz polimérica da nanoesfera; **d)** Fármaco adsorvido ou disperso na matriz da nanoesfera. Retirado de Guterres *et al.*, 2003; Mohanraj *et al.*, 2006.

1.8 Sistemas nanoparticulados de quitosana e galactana sulfatada

Atualmente na literatura têm sido descritos trabalhos relacionados à nanoparticulação de quitosana (QT) associada a inúmeros polissacarídeos aniônicos, pode-se citar dentre eles, alginato (Silva *et al.*, 2010) e condroitim sulfato (da Silva *et al.*, 2012). No entanto, não há relatos científicos sobre Np de QT associada à GS (Dash *et al.*, 2011).

Sabe-se que a QT é obtida a partir da quitina, e além disso é definida como um polissacarídeo linear, composto de unidades de D-glucosamina e N-scetil-D-glucosamina, encontrada sob a forma catiônica em pH ácido, sendo capaz de produzir complexos insolúveis quando em água, e detentora de propriedade mucoadesiva. Este biopolímero é considerado um agente complexante natural, possuindo a habilidade de formar géis ou coacervados com polissacarídeos sulfatados (da Silva *et al.*, 2012).

Com base nisto, e sabendo que é fundamental levar em consideração a via de administração para a escolha do polímero matricial, ao se propor a administração oral da futura Np, a QT (**Fig 11**) demonstra ser um polímero de matriz com características favoráveis para o desenvolvimento de nanoesferas de GS, visto que a QT possui natureza catiônica, alta densidade de cargas positivas em soluções ácidas, formando complexos insolúveis em associação com polímeros aniônicos hidrossolúveis, em meio alcalino ou neutro, e também é aprovada para formulações cuja via de administração seja extraparenteral.

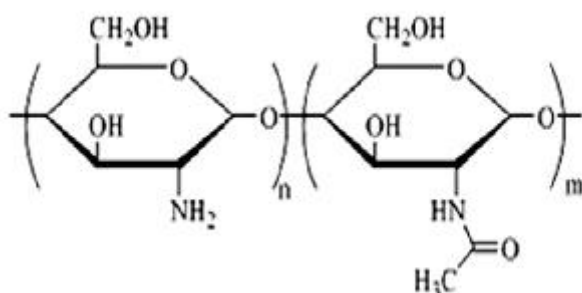


Fig 11. Ilustração da estrutura dimérica da QT. Retirado de Dash *et al.*, 2011.

2 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolvimento de um sistema nanoparticulado - composto por quitosana e galactana sulfatada oriundo da alga marinha *B. occidentalis* - que mantenha sua atividade anticoagulante. Produção e caracterização das nanopartículas.

2.2 Objetivos Específicos

Extração proteolítica e purificação através de cromatografia de troca iônica em DEAE celulose da galactana sulfatada oriunda da *B. occidentalis* de acordo com os trabalhos publicados.

Produção das nanopartículas através da técnica de nanocoacervação, e caracterização por Espalhamento Dinâmico de Luz.

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente existem diversos dados na literatura que relatam de forma inequívoca a participação da GS da *B. occidentalis* no processo de inibição da coagulação sanguínea e trombose. Esses trabalhos publicados demonstram tanto através de modelos *in vivo* quanto através de modelos *in vitro* à atividade anticoagulante e antitrombótica desse polissacarídeo sulfatado, o qual é tão potente quanto à heparina, principal medicamento utilizado na clínica médica com propósito anticoagulante.

Paralelamente, há trabalhos que apresentam o desenvolvimento de nanossistemas contendo polissacarídeos sulfatados - condroitim sulfato ou fucoidana da alga *Fucus vesiculosus* - juntamente a quitosana, onde estas nanopartículas desenvolvidas preservam suas atividades anticoagulantes.

Sabe-se ainda, que não há dados na literatura sobre estudos de GS sob a forma de Np para terapia anticoagulante via administração oral, e que o proposto agente farmacológico, GS, como um polímero, possui boa solubilidade aquosa, sendo assim a nanoesfera a melhor opção.

Por sua vez a QT foi o polímero de escolha, devido a sua capacidade de formar coacervados com PS, isto se deve a interações iônicas, que proporcionam a formação de um complexo, desta maneira não se faz necessário o uso de solventes orgânicos ou catalisadores. Portanto, aliviando a preocupação relacionada à toxicidade dessas Np (Dash *et al.*, 2011).

E, além disso, a QT é um polímero natural (assim como a GS), e de característica biodegradável, apresentando resultados satisfatórios relacionados à estudos anteriores de Np contendo outros PS (fucoidan e condroitim sulfato) (da Silva *et al.*, 2012).

Estes dados supracitados (existência da galactana sulfatada com potente atividade e possibilidade de produção de nanopartículas compostas por polissacarídeos sulfatados) nos direcionaram ao desenvolvimento de nanossistemas que apresentam a GS como fármaco e a QT como matriz da nanoesfera.

Diante da incidência de doenças relacionadas a contaminações em mamíferos (tanto por príons quanto por vírus causador da “gripe suína”); efeitos colaterais como, por exemplo, o hemorrágico; e devido à necessidade crescente por alternativas de terapia anticoagulante e antitrombótica, teve-se por objetivo unir as vantagens proporcionadas pela atividade anticoagulante da GS aos sistemas nanométricos. Visto que a GS sob a forma de Np, além de manter a redução da incidência das doenças anteriormente citadas e dos efeitos colaterais (reduções proporcionadas pela própria GS da *B.occ*), também auxiliará na adesão do paciente ao tratamento farmacológico, sendo possivelmente administrada por via oral. Fato possibilitado pela nanoparticulação do fármaco, sendo este nanossistema capaz de aumentar a estabilidade de fármacos como por exemplos glicídeos, como o caso da GS em questão. Com este intuito foram formuladas nanopartículas de GS e QT. Além de todas essas vantagens, deve-se ressaltar, que a GS é um PS abundantemente encontrado na alga marinha *Botryocladia occidentalis*, e de fácil obtenção. Assim como sua nanoparticulação é realizada facilmente e por um método (nanocoacervação) considerado “limpo”.

Desta maneira espera-se obter Np que possam ser utilizadas na clínica médica, sendo administradas por via oral, proporcionando um maior conforto ao paciente e que principalmente diminua significativamente os riscos inerentes tanto a contaminações por xenobióticos quanto a efeitos colaterais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Método de extração de polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas

O processo de extração de polissacarídeos sulfatados foi realizado com enzima proteolítica, conforme metodologia estabelecida em nosso laboratório por Farias e colaboradores (2000). A alga marinha *Botryocladia occidentalis* foi coletada na Praia do Pacheco no Ceará por colaboradores, em seguida foi lavada e seca em estufa a temperatura ambiente, sendo posteriormente enviada por correio para o Laboratório Integrado de Prospecção em Produtos Bioativos – Grupo de Glicofármacos.

À alga *Botryocladia occidentalis* foi adicionado o equivalente a 10% do seu peso seco em papaína e tampão digestão (0,1 M de acetato de sódio (pH 5,5), 5 mM de EDTA e 5 mM de cisteína). Este material foi mantido em banho Maria a 60°C por 24 horas. O produto resultante deste processo foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi reservado, e o precipitado (alga) retornou ao processo de extração até que não fosse detectado PS no seu sobrenadante. Todos os sobrenadantes - ricos em PS – foram unidos, e foi adicionado uma solução de CPC 10% (Cloreto de Cetil Piridina, tensoativo catiônico) Sigma ® na proporção de 10:1 (Material seco inicial: CPC 10%) para que ocorresse a complexação de GS com CPC e conseguinte precipitação. O precipitado foi obtido por centrifugação a 3100 rpm por 10 minutos.

Posteriormente o precipitado foi lavado com CPC 0,05% para retirar o excesso de CPC (CPC que não complexou com o PS), obtendo um único precipitado, o qual foi desfeito com a adição de solução Etanol: NaCl 3M (15: 100). Centrifugou-se várias vezes para a retirada da espuma excessiva, e se realizou a precipitação em etanol 92,5% (álcool comercial Pring ®) (1: 1), armazenando o mesmo a 4°C, overnight. O precipitado obtido foi lavado com 10 ml de etanol 80% e centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm, por duas vezes, onde subsequentemente foi seco ao ar livre (overnight), e solubilizado em água destilada. Em seguida o material foi dialisado exaustivamente contra água destilada para retirada de sal, rotaevaporado e por fim liofilizado, obtendo-se os polissacarídeos totais.

4.2 Purificação de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas

A GS foi obtida através de purificação em coluna de troca iônica em DEAE-celulose Sigma®, seguindo a metodologia estabelecida em nosso laboratório (Cinelli *et al.*, 2007). Inicialmente se solubilizou o material em tampão sem sal Tris 20mM, EDTA 10Mm, em seguida este foi aplicado a matriz equilibrada no mesmo tampão. Após lavagem exaustiva foi adicionado tampão Tris 20mM, EDTA 10Mm, 3M.

O fluxo programado foi de 0,5mL/ minuto. Após a cromatografia, as frações obtidas foram monitoradas por meio de reação metacromática com DMB (Sigma-Aldrich) e analisadas pelo Espectrofotômetro UV biospectro a 525nm. Em seguida, as frações purificadas foram dialisadas (em membrana de 12-15 KDa) exaustivamente contra água destilada, e liofilizadas para caracterização por eletroforese em gel de agarose 0,5%.

4.3 Identificação dos polissacarídeos sulfatados por eletroforese em gel de agarose

A identificação da GS foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,5%, método desenvolvido por Dietrich e Dietrich (1976). Aproximadamente 10 µg de cada padrão, heparina bovina e condroitim sulfato de tubarão, e 12 ug de galactana sulfatada extraída da *Botryocladia occidentalis* foram aplicados em lâminas de gel de agarose 0,5% e foram submetidos à eletroforese no tampão 1,3 diaminopropano 0,05 M pH 9,0 (100 V, 4°C, 1 hora). A seguir, os compostos foram precipitados no gel com CETAVLON 0,1%.

O gel fixado com CETAVLON, após seco sob calor e ventilação, foi corado com azul de toluidina 0,1% para identificação do PS (Cinelli *et al.*, 2009).

4.4 Preparo de nanopartículas polissacarídicas

As nanoesferas foram preparadas através da técnica de nanocoacervação segundo da Silva et al., 2012 (**Fig 12**). Primeiramente foram preparadas as soluções de quitosana de Baixo Peso Molecular (Sigma Aldrich®) em ácido acético P.A. Glacial (VETEC) a 0,1%, e solução de galactana sulfatada em Borato de sódio decahidratado Merck® K.G.A. (Bórax) a 0,1%. 10 ml da solução de quitosana foi vertida em um becker e submetida a agitação magnética de 700 rpm em placa de agitação magnética IKA® C-MAG HS7, e banho de gelo, enquanto 10ml da solução de galactana sulfatada foi contida em uma seringa posicionada a 10 cm do becker supracitado.

O gotejamento foi realizado com auxílio Agulha BD Precision Glide® 0,45X13 26G½ e Gotejador Automático Cole-Parmer® 74900-00,-05 Syringe Pump programado a 30 ml/hora. A sonicação foi realizada através de Sonicador Hielscher® UP-100H Ultrasonic Processor 100% de amplitude do equipamento de forma constante.

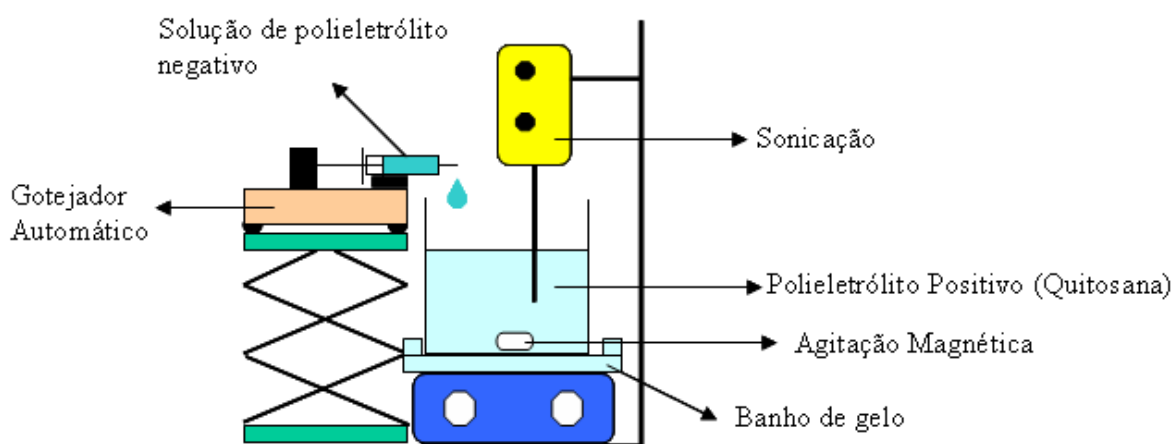


Fig 12. Esquema representativo da técnica de gotejamento utilizada no preparo das Np (nanoesferas de GS e QT).

4.5 Determinação de diâmetro médio de partícula

Após a obtenção das N_p , alíquotas suficientes das dispersões foram analisadas pelo espalhamento dinâmico de luz (EDL), através do equipamento Zetasizer Nano series S-90, com ângulo de detecção de aproximadamente 90° , índice de refração aproximado de 1,33, e 100 varreduras ao longo de dois minutos (para cada amostra), à temperatura de 25°C . Este ensaio forneceu a distribuição do DM das partículas em dispersão concomitantemente aos resultados de índice de polidispersividade (da Silva *et al.*, 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e purificação da galactana sulfatada proveniente da alga *Botryocladia occidentalis*

A alga foi submetida a extração proteolítica, e o extrato total dos polissacarídeos sulfatados foi purificado em coluna de troca-íonica DEAE-celulose, onde a matriz foi lavada com tampão sem sal (Tris 20mM, EDTA 10Mm). A partir da fração 12 o tampão de equilíbrio foi suplementado com 4M de NaCl para eluição da GS. Dados da literatura mostram que a GS elui a uma molaridade de NaCl 3M (Farias et al., 2000). Após a cromatografia, as frações de cada tubo foram analisadas por espectrofotometria a 525nm na presença de DMB, onde os tubos (frações) 32 a 38 apresentaram maiores absorbâncias, confirmando a eluição da GS dentre essas frações.

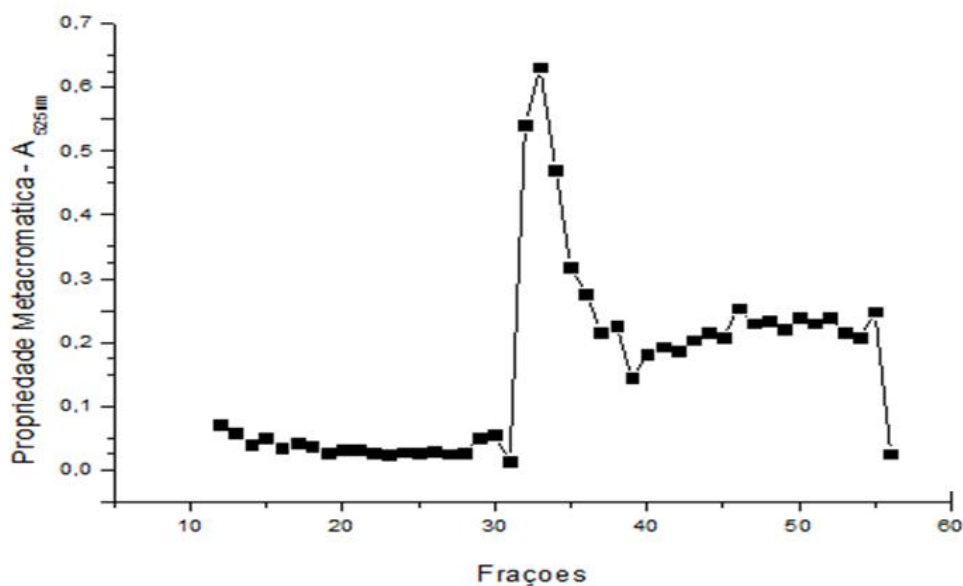


Fig 13. Gráfico ilustra a Cromatografia por troca iônica. Realizada com tampão sem sal inicialmente até a fração 11, e a partir da fração 12 com tampão a 3M, onde pode-se observar a eluição da GS nas frações 32 a 38.

As frações 32 a 38 foram unidas e submetidas à diálise para a retirada do sal, seguida de uma liofilização.

A confirmação da purificação da GS pôde ser comprovada através de caracterização por eletroforese em gel de agarose 0,5% (**Fig 14**), que demonstrou migração semelhante à descrita na literatura, migrando abaixo da heparina e sendo arrastada entre o padrão de heparina e condroitim sulfato.

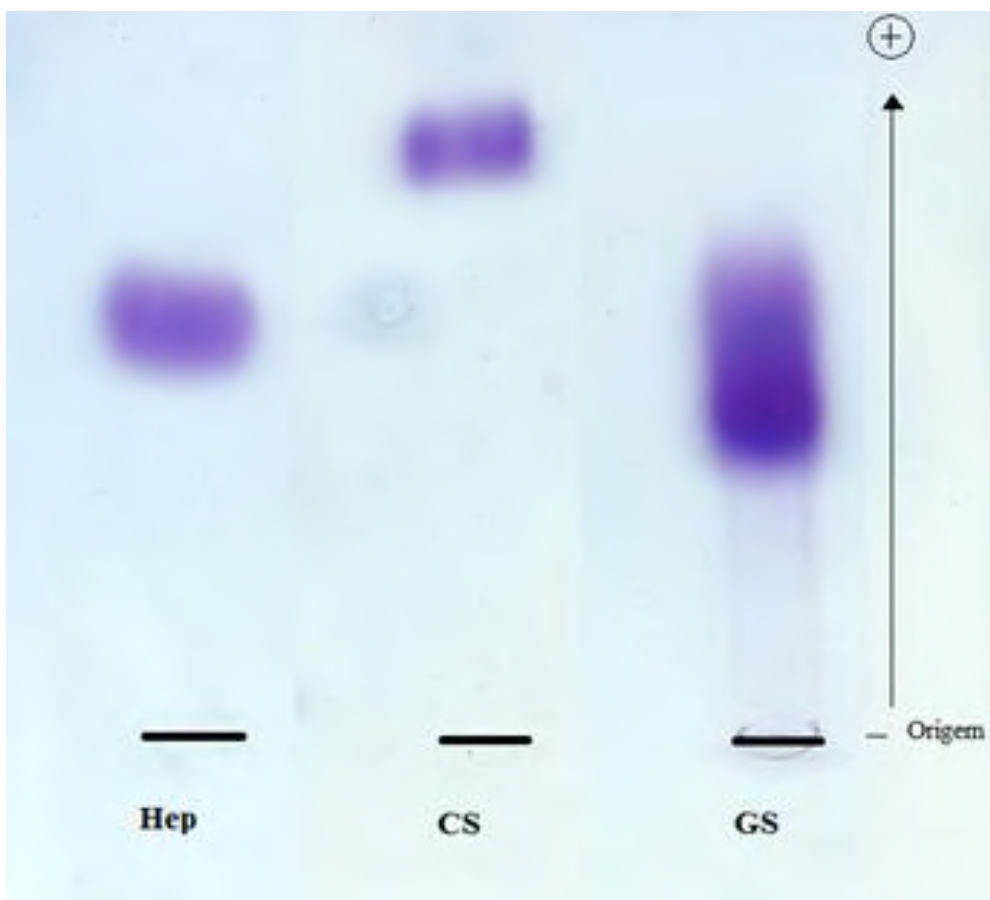


Fig 14. Eletroforese em gel de agarose. O gel mostra a migração da GS (12µg) extraída da *Botryocladia occidentalis*, quando comparada aos padrões de heparina bovina 6µg (Hep) e de condroitim sulfato extraído de tubarão 6µg (CS). A seta ilustra a direção da migração das amostras, onde estas possuem sua origem no pólo negativo e migram em direção ao pólo positivo.

5.2 Preparo de nanopartículas polissacarídicas

Após a purificação da GS deu-se início a produção das nanoesferas de QT e GS, onde foram utilizadas soluções de GS e QT, ambas a 0,1%, pois nesta concentração a QT é facilmente solúvel em meio ácido (ácido acético). No entanto, acima da concentração de 0,1% a QT se torna parcialmente solúvel, mesmo quando submetida a agitação e ultrassom. Além disso, quando em concentração superior a esta anteriormente descrita, a QT tem sua viscosidade aumentada, característica esta que desfavorece o gotejamento, pois dificulta a passagem da solução pela seringa/agulha. Outro motivo para a utilização da referida concentração foi o fato desta já ter sido usada em outros trabalhos (Sarmiento *et al.*, 2007), e na produção de nanopartículas de fucoïdam e quitosana, e condroitim sulfato e quitosana (Da Silva *et al.*, 2012).

Utilizou-se o tampão bórax, pois segundo da Silva e colaboradores (2012), este tampão exerceu influencia positiva na diminuição de DM e IP das Np quando comparado à utilização de água MilliQ.

As dispersões obtidas apresentaram turbidez quando comparadas com suas respectivas soluções iniciais, característica física a qual sugere a formação das Np. Porém, para se obter a confirmação são necessários a realização de outros testes (que sejam de caracterização direta), dentre eles, o espalhamento dinâmico de luz (EDL); microscopia eletrônica de transmissão (MET); e potencial zeta (PZ).

5.3 Determinação de diâmetro médio de partículas

Assim como tamanho, o IP também influencia, visto que este é variância relativa (homogeneidade) dos diâmetros de partículas em dispersão, quanto menor o IP, melhor será a formulação. Desta maneira, foi realizado um teste de EDL, para caracterizar as Np através de seu DM e IP. O equipamento realizou análise em triplicata de cada amostra analisada (Np).

Posteriormente à obtenção dos resultados de DM e IP calcularam-se as respectivas médias para cada Np (foram produzidas duas Nps independentes, ambas com a proporção 1 GS: 1 QT) e em seguida se calculou a média das médias dos resultados das duas formulações, onde obtiveram-se os seguintes gráficos. Pode-se inferir a partir disso, que as formulações apresentaram resultados satisfatórios, possuindo média (249,25) e DP (4,73) de DM baixos, assim como, média (0,181) e DP (0,016) de IP baixos, fatores desejáveis, a fim de evitar a fagocitose das Np pelo sistema imunológico e garantir a homogeneidade do diâmetro médio das partículas, respectivamente.

6 CONCLUSÃO

Segundo dados da literatura, a extração, purificação e identificação da GS foram bem sucedidas. Pode-se inferir que as nanoformulações apresentaram resultados satisfatórios, possuindo uma média e DP de polidispersividade assim como média e DP de DM relativamente baixos. É possível afirmar através do ensaio de espalhamento dinâmico de luz que essas partículas obtidas em dispersão se encontram na escala nanométrica, resultados estes que serão confirmados futuramente em um ensaio de caracterização através da MET.

Contudo, pode-se concluir que a nanoparticulação da GS trará vantagens tanto farmacotécnicas quanto terapêuticas, não sendo necessário o emprego de surfactantes ou solventes orgânicos à formulação, eliminando preocupações em relação a toxicidade; reduzindo contaminações por xenobióticos e efeitos colaterais como a hemorragia (vantagens inerentes ao PS, GS); e poderá ainda aumentar a estabilidade da GS frente a degradação no trato gastrointestinal, possibilitando sua administração por via oral sob a forma de nanoesferas.

7 PERSPECTIVAS

Tem-se como perspectiva dar continuidade aos estudos de caracterização das Np poliméricas, através de ensaios de MET, e PZ; realizar curva padrão e ensaios em suco gástrico simulado e suco entérico simulado a fim de estudar o perfil de liberação da GS nanoformulada; realizar ensaios biológicos como o de aPTT, para verificar se a Np irá manter sua atividade anticoagulante. Pretende-se também testar a robustez do método de nanocoacervação, alterando a metodologia (testando o gotejamento da solução de quitosana em solução de GS, ao invés do inverso como foi realizado). Com tudo espera-se desenvolver uma Np inovadora, que seja administrada oralmente e possa ser utilizada como uma alternativa para o tratamento anticoagulante.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alessandra Ströher, Cristián Jesús Velásquez Armijo, Renata Platchek Raffin.

Nanocosméticos: Conceitos, Vantagens e Aplicações. *Cosmetics & Toiletries* vol 22, 2010.

A.v. Hoffbrand, P. A. H. Moss & J. E. Pettit. (2008) Plaquetas, coagulação do sangue e hemostasia; Distúrbios da coagulação. In: A. V. Hoffbrand e P. A. H. Moss: Fundamentos em Hematologia, 5ª edição. Artmed, São Paulo.

Chaves^I; Costa^{I,*}; Almeida^{II}; Frattani^{III}; Assafim^{III}; Zingali^{III}. Secondary metabolites from vegetal origin: a potential source of antithrombotic drugs. *Quím. Nova* vol.33 no.1 São Paulo 2010

Cinelli LP, Castro MO, Santos LL, Garcia CR, Vilela-Silva AC, Mourão PA. Expression of two different sulfated fucans by females of *Lytechinus variegatus* may regulate the seasonal variation in the fertilization of the sea urchin. *Glycobiology*. 2007 Aug;17(8):877-85.

Cinelli LP, Vilela-Silva AC, Mourão PA. Seminal fluid from sea urchin (*Lytechinus variegatus*) contains complex sulfated polysaccharides linked to protein. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2009 Sep;154(1):108-12.

da Silva LC, Garcia T, Mori M, Sandri G, Bonferoni MC, Finotelli PV, Cinelli LP, Caramella C, Cabral LM. Preparation and characterization of polysaccharide-based nanoparticles with anticoagulant activity. *Int J Nanomedicine*. 2012.

Dietrich CP, Dietrich SMC. (1976). Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal. Biochem.*, 70(2): 645-647.

Eva, M., Muñoz, Robert, J., Linhardt. (2004) Heparin-Binding Domains in Vascular Biology *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 24:1549-1557.

Farias WR, Valente AP, Pereira MS, Mourão PA. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *J Biol Chem*. 2000 Sep 22;275(38):29299-307.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F.. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. V. 69, p. 1–9, 2008.

Glauser BF, Rezende RM, Melo FR, Pereira MS, Francischetti IM, Monteiro RQ, Rezaie AR, Mourão PA. Anticoagulant activity of a sulfated galactan: serpin-independent effect and specific interaction with factor Xa. *Thromb Haemost.* 2009 Dec;102(6):1183-93. doi: 10.1160/TH09-04-0273. PubMed PMID: 19967150; PubMed Central PMCID: PMC2791905.

Glauser BF, Rezende RM, Melo FR, Pereira MS, Francischetti IM, Monteiro RQ, Rezaie AR, Mourão PA. Anticoagulant activity of a sulfated galactan: serpin-independent effect and specific interaction with factor Xa. *Thromb Haemost.* 2009 Dec;102(6):1183-93.

Goodman e Gilman (2005) *As bases farmacológicas da terapêutica*, 11^a Ed.

Hlawaty H, Suffee N, Sutton A, Oudar O, Haddad O, Ollivier V, Laguillier-Morizot C, Gattegno L, Letourneur D, Charnaux N. Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression. *Biochem Pharmacol.* 2011 Jan 15;81(2):233-43.

Hu T, Liu D, Chen Y, Wu J, Wang S. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro. *Int J Biol Macromol.* 2010 Mar 1;46(2):193-8.

Hwang PA, Chien SY, Chan YL, Lu MK, Wu CH, Kong ZL, Wu CJ. Inhibition of Lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses by *Sargassum hemiphyllum* sulfated polysaccharide extract in RAW 264.7 macrophage cells. *J Agric Food Chem.* 2011 Mar 9;59(5):2062-8.

Jin JO, Song MG, Kim YN, Park JI, Kwak JY. The mechanism of fucoidan-induced apoptosis in leukemic cells: involvement of ERK1/2, JNK, glutathione, and nitric oxide. *Mol Carcinog.* 2010 Aug;49(8):771-82.

Karnjanapratum S, You S. Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. *Int J Biol Macromol.* 2011 Mar 1;48(2):311-8.

KOO, O.M.; RUBINSTEIN, I; ONYUKSEL, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* V. 1, p. 193– 212, 2005.

Koyanagi S, Tanigawa N, Nakagawa H, Soeda S, Shimeno H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem Pharmacol.* 2003 Jan 15;65(2):173-9.

Liaw, P. C. Y., Austin, C. R., Fredenburgh, J. C., Stafford, A. R. e Weitz, J. I. (1999) Comparison of heparin and dermatan sulfate mediate catalysis of thrombin inactivation by heparin cofactor II. *J. Biol. Chem.*, 274: 27597-27604.

Luyt CE, Meddahi-Pellé A, Ho-Tin-Noe B, Collic-Jouault S, Guezenec J, Louedec L, Prats H, Jacob MP, Osborne-Pellegrin M, .

M. Dasha;F. Chiellini; R.M. Ottenbriteb; E. Chiellini. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. V.36, p. 981-1014, 2011.

Mabeau S., Kloareg B., Joseleau J. P. (1990) Fractionation and analysis of fucans from brown algae. *Phytochemistry.* 29:2441-2445

Makarenkova ID, Besednova NN, Zaporozhets TS. [Antiviral action of sulfated polysaccharides]. *Antibiot Khimioter.* 2009;54(1-2):56-62. Review.

Mathews, M. B. (1975) Polyanionic proteoglycans. Em: *Conective tissue: Macromolecular structure and evolution.* Kleinzeller, A., Springer, G. F. e Witmann, H. G., Eds. Springer-Verlaq, Berlin, 93-125.

Melo FR, Mourão PA. An algal sulfated galactan has an unusual dual effect on venous thrombosis due to activation of factor XII and inhibition of the coagulation proteases. *Thromb Haemost.* 2008 Mar;99(3):531-8. doi: 10.1160/TH07-10-0649. PubMed PMID: 18327401.

Melo FR, Pereira MS, Foguel D, Mourão PA. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides: different mechanisms for heparin and sulfated galactans. *J Biol Chem.* 2004 May 14;279(20):20824-35.

Melo FR, Pereira MS, Foguel D, Mourão PAS. (2004) Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides: different mechanisms for heparin and sulfated galactans. *J. Biol. Chem.* 279:20824-35.

Melo FR, Pereira MS, Monteiro RQ, Foguel D, Mourão PA. Sulfated galactan is a catalyst of antithrombin-mediated inactivation of alpha-thrombin. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Sep;1780(9):1047-53.

MOHANRAJ, V.J.; CHEN, Y.. Nanoparticles – A Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. V. 5, p. 561-573, 2006.

Percival E., Ross A. G. (1950) The isolation and purification of fucoidin from Brown seaweeds. J Chem Soc. 717-720

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P.. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. International Journal of Antimicrobial Agents. V. 13, p. 155–168, 2000.

Guterres,S.S; Pohlmann, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. Quím. Nova. V. 26, p. 726-737, 2003.

SARMENTO B.; RIBEIRO A.; VEIGA F.; FERREIRA D.; NEUFELD R. Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles. Biomacromolecules. V.10, p. 3054–60, 2007.

SILVA, Mariana dos Santos et al . Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. Quím. Nova, São Paulo , v. 33, n. 9, 2010 .

Streusand, V., Björk, I., Gettins, P. G. W., Petitou, M., Oslon, S. T. (1995) Mechanism of acceleration of antithrombin-proteinase reactions by low affinity heparin: role of the antithrombin binding pentasaccharide in heparin rate enhancement. J. Biol. Chem. 270: 9043-9051.

Tollefsen, D. M. (1994) The interaction of glycosaminoglycans with heparin cofactor II. Ann. N. Y. Acad. Scie., 714: 21-31

Trincherro J, Ponce NM, Córdoba OL, Flores ML, Pampuro S, Stortz CA, Salomón H, Turk G. Antiretroviral activity of fucoidans extracted from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*. Phytother Res. 2009 May;23(5):707-12.

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. European Journal V. 41, p. 923–932, 2005.

Yanagishita, M. (1993). A brief history of proteoglycans. Experientia 49: 366-68.