



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ
CURSO DE FARMÁCIA



ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DOS POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DA MACROALGA MARINHA *PENICILLUS CAPITATUS*

THAMYRIS ALMEIDA MOREIRA

Macaé
Julho de 2013

Moreira, Thamyris Almeida, 1990

Isolamento e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha *Penicillus capitatus* / Thamyris Almeida Moreira. – Rio de Janeiro, 2013.

41 f.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Curso de Farmácia, 2013

1. Farmacognosia. 2. Glicídeos. I. Cinelli, Leonardo Paes. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Farmácia. III. Isolamento e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha *Penicillus capitatus*

THAMYRIS ALMEIDA MOREIRA

Título: Isolamento e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha *Penicillus capitatus*

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

“¹Debaixo do céu há momento para tudo, e tempo certo para cada coisa: ²Tempo para nascer e tempo para morrer. Tempo para plantar e tempo para arrancar a planta. ³Tempo para matar e tempo para curar. Tempo para destruir e tempo para construir. ⁴Tempo para chorar e tempo para rir. Tempo para gemer e tempo para bailar. ⁵Tempo para atirar pedras e tempo para recolher pedras. Tempo para abraçar e tempo para se separar. ⁶Tempo para procurar e tempo para perder. Tempo para guardar e tempo para jogar fora. ⁷Tempo para rasgar e tempo para costurar. Tempo para calar e tempo para falar. ⁸Tempo para amar e tempo para odiar. Tempo para a guerra e tempo para a paz. ⁹Que proveito o trabalhador tira de sua fadiga? ¹⁰Observei a tarefa que Deus entregou aos homens, para com ela se ocuparem: ¹¹tudo o que ele fez é apropriado para cada tempo. Também colocou o senso da eternidade no coração do homem, mas sem que o homem possa compreender a obra que Deus realiza do começo até o fim. ¹²Então compreendi que não existe para o homem nada melhor do que se alegrar e agir bem durante a vida. ¹³E compreendi também que é dom de Deus que o homem possa comer e beber, desfrutando do produto de todo o seu trabalho. ¹⁴Compreendi que tudo o que Deus fez dura para sempre. A isso nada se pode acrescentar, e disso nada se pode tirar. Deus fez assim para ser temido. ¹⁵O que existe, já havia existido; o que existirá, também já existiu. Deus busca aquilo que foge. ¹⁶Observei outra coisa debaixo do sol: Em lugar do direito, encontra-se o injusto. ¹⁷E concluí que o justo e o injusto estão debaixo do julgamento de Deus, por que existe tempo para cada coisa e um julgamento para cada ação”.

(Eclesiastes, 3, 1-17)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, que me sustentou nos momentos difíceis, me confortando e me concedendo essa grande vitória.

Aos meus pais, Paulo e Dilene, e ao meu irmão, Nathã, que apesar da distância estiveram comigo todo o tempo, me apoiando e incentivando nessa jornada. Obrigada pela confiança, pelo investimento, pelo exemplo que foram, pelo amor e pela dedicação.

A minha amiga Bianca, com quem convivi a maior parte nessa etapa e que se tornou muito importante na minha vida, me ajudando a chegar até aqui. Obrigada por fazer parte da minha vida, pelos momentos de alegria, diversão e choro durante esses anos, que, se Deus quiser, serão os primeiros de muitos.

Ao meu orientador, Leonardo Cinelli, pelos ensinamentos, orientação, “puxões de orelha” e conversas. Sem a sua efetiva ajuda esse trabalho não sairia.

A todas as meninas do laboratório, Regina, Rayssa e Brandão, pela convivência todos os dias no lab, cada conversa e cada ajuda nos experimentos.

Aos nossos colaboradores, a mestrande Thalia Sampaio e a Profa. Angelica Ribeiro Soares que nos cederam a alga e ao Gustavo que nos ajudou em alguns experimentos.

Aos meus amigos, que estiveram nos momentos ruins e momentos bons, tornando os meus dias mais divertidos.

Ao CNPq e FAPERJ pelos convênios e auxílios concedidos.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | - Ilustração das três classes de algas marinhas..... | 13 |
| Figura 2 | - Principais polissacarídeos presentes nas algas marinhas verdes, pardas e vermelhas..... | 13 |
| Figura 3 | - Ilustração da estrutura química da celulose e da quitina..... | 14 |
| Figura 4 | - Estrutura de fucanas..... | 16 |
| Figura 5 | - Estrutura química da galactana da alga <i>G.crinale</i> | 16 |
| Figura 6 | - Cascata de coagulação sanguínea..... | 18 |
| Figura 7 | - Sequência pentassacarídica específica de ligação da heparina a antitrombina..... | 18 |
| Figura 8 | - Estrutura da galactana sulfatada da alga vermelha <i>B.occidentalis</i> | 19 |
| Figura 9 | - Eletroforese em gel de agarose das frações ricas em polissacarídeo sulfatado do extrato precipitado em concentrações crescentes de etanol da alga marinha <i>Penicillus capitatus</i> | 27 |
| Figura 10 | - Atividade anticoagulante das frações polissacarídicas precipitadas em etanol..... | 28 |
| Figura 11 | - Cromatograma dos polissacarídeos da F30 extraídos da alga marinha <i>Penicillus capitatus</i> em cromatografia de troca iônica (DEAE – celulose)..... | 29 |
| Figura 12 | - Eletroforese em gel de agarose das frações ricas em polissacarídeo sulfatado obtidos através da cromatografia de troca iônica da F30 da alga marinha <i>Penicillus capitatus</i> | 30 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 13 | - Cromatograma dos polissacarídeos da F80 extraídos da alga marinha <i>Penicillus capitatus</i> em cromatografia de troca-iônica (DEAE – celulose)..... | 31 |
| Figura 14 | - Eletroforese em gel de agarose das frações ricas em polissacarídeo sulfatado obtidos através da cromatografia de troca iônica da F80 da alga marinha <i>Penicillus capitatus</i> | 32 |
| Figura 15 | - Atividade anticoagulante das frações obtidas através da cromatografia a F30 da alga marinha <i>P.capitatus</i> | 33 |
| Figura 16 | - Atividade anticoagulante das frações obtidas através da cromatografia a F80 da alga marinha <i>P.capitatus</i> | 34 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Dosagem dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha <i>P. capitatus</i> das frações extraídas por precipitação em concentrações crescentes de etanol..... | 26 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIações

- aPTT - Tempo de tromboplastina parcialmente ativada
- F10 - Fração precipitada na concentração final de 10% de etanol
- F30 - Fração precipitada na concentração final de com 30% de etanol
- F80 - Fração precipitada na concentração final de com 80% de etanol
- F150 - Fração precipitada na concentração final de com 150% de etanol
- F300 - Fração precipitada na concentração final de com 300% de etanol
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 12 |
| 1.1 Algas marinhas..... | 12 |
| 1.2 Polissacarídeos..... | 14 |
| 1.2.1 Polissacarídeo sulfatado..... | 15 |
| 1.2.1.1 Polissacarídeo sulfatado de alga..... | 15 |
| 1.3 Atividade anticoagulante..... | 17 |
| 2. Justificativa..... | 21 |
| 3. Objetivos..... | 22 |
| 3.1 Objetivos gerais..... | 22 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 22 |
| 4. Materiais e Métodos..... | 23 |
| 4.1 Extração..... | 23 |
| 4.2 Precipitação..... | 23 |
| 4.3 Dosagem..... | 24 |
| 4.4 Eletroforese..... | 24 |
| 4.5 Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (aPTT)..... | 24 |
| 4.6 Cromatografia de troca-iônica..... | 25 |
| 5. Resultado e discussão..... | 26 |
| 6. Conclusões..... | 35 |
| 7. Referências bibliográficas..... | 36 |

RESUMO

As algas marinhas são fontes naturais de macromoléculas conhecidas como polissacarídeos sulfatados. Esta classe de compostos é amplamente encontrada na natureza e suas propriedades farmacológicas, como anticoagulante, antiplaquetário e antitrombótico, têm atraído grande interesse nas Ciências Farmacêuticas. Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados extraídos da alga *Penicillus capitatus*. Os polissacarídeos sulfatados extraídos e, posteriormente, precipitados com concentrações crescentes de etanol, foram caracterizados por eletroforese em gel de agarose e quantificados. Os resultados obtidos em eletroforese mostraram que há compostos com migração mais lenta que a heparina, utilizada como padrão, sugerindo alto grau de sulfatação dos polissacarídeos. A quantificação do material mostrou que a fração F80 obteve a maior concentração de polissacarídeos sulfatados. Em seguida, realizou-se o teste do tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), onde observou-se que as frações F80 e F30 possuem atividade anticoagulante relevante. Devido à elevada atividade destas frações, foi realizada cromatografia de troca-iônica em ambas. Os polissacarídeos da F30 eluíram em 0,5 e 1,0 M NaCl e os do F80 em 0,3, 0,5 e 1,0 M NaCl. Esse material purificado foi resubmetido ao teste de aPTT, onde observou-se que a atividade anticoagulante foi inferior quando comparado a atividade do extrato bruto das suas respectivas frações. Como direções futuras, pretendemos confirmar os resultados do teste de aPTT com o material já purificado, obter esses compostos com alto grau de pureza e utilizá-los em outros testes *in vitro*, afim de elucidar sua estrutura química e determinar o seu mecanismo de ação anticoagulante.

Palavras-chave: alga marinha, polissacarídeo sulfatado, anticoagulante, *Penicillus capitatus*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Algas marinhas

As algas marinhas formam um grupo diverso e são consideradas plantas fotossintéticas, que possuem basicamente clorofila e pigmento acessórios sendo também capazes de sintetizar substâncias que são necessárias ao seu metabolismo normal (Van Den Hoek, 1995).

Antigamente as algas eram somente utilizadas como alimento, tanto para os seres humanos quanto para os animais, como fertilizantes, dentre outras aplicações menos expressivas, mas com o passar dos anos tem-se descoberto outra gama de aplicações. Dentre as novas áreas de pesquisas com as algas marinhas podemos destacar as indústrias de processamento alimentar, a medicina e a biotecnologia, visto que as algas tornaram-se uma fonte rica em vários compostos importantes (Pereira *et al.*, 2008). Segundo Yarish e Pereira a procura por alga aumentou consideravelmente, o que deixou as fontes naturais insuficientes para o seu fornecimento. Devido a esse fato, teve-se a necessidade de promover o desenvolvimento do seu cultivo. Com isso, atualmente no mercado comercial quase que toda a demanda de algas marinhas é suprida por algas produzidas por técnicas de aquicultura. Neste mercado de produção se destacam os países do sudeste asiático e o Chile (Pereira *et al.*, 2006).

As algas marinhas são classificadas baseadas em sua coloração que se compõe de três principais classes reconhecidas, as classes clorófitas, feofíceas e rodófitas (Figura 1) (Boney, 1966).

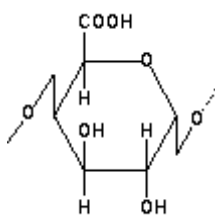
As algas marinhas verdes ou clorófitas, têm um tamanho similar às algas vermelhas, mas são consideradas pequenas quando comparada as algas pardas, e a sua parede celular contém basicamente celulose. A alga em estudo, *Penicillus capitatus* compõe essa classe de algas marinhas, sendo que não há nenhuma descrição da mesma na literatura. As algas marinhas pardas ou feofíceas, possuem em sua parede celular majoritariamente alginatos, fucoidanas e celulose (Boney, 1996) e pode ser considerada a alga de maior tamanho comparada às outras duas já que comumente pode alcançar até 50 metros. Por fim, a última classe de algas marinhas são as rodófitas ou algas marinhas vermelhas. Em sua parede

pode-se encontrar basicamente ésteres poligalactoses e celulose, podendo apresentar também carbonato de cálcio (McHugh, 2003).

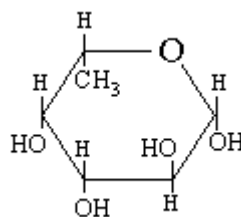


Figura 1: Fotos da alga clorófitica (verde) *Caulerpa* (chlorophyta, Ulvohyceae), da alga feofíceica (parda) *Sargassum* (Ochrophyta, Phaeophyceae) e da alga rodofíceas (vermelha) *Plocamium* (Rhodophyta). Retirado do site www.uff.br na data 14/06/13.

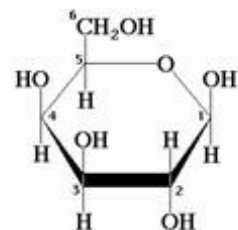
O que diferencia, principalmente, as classes das algas marinhas é a composição da sua parede celular. A celulose está presente em todas as classes. No entanto, pode estar associada à pectina da parede celular e à algina, dentre outras substâncias. Existem alguns componentes da parede celular das algas que são características específicas. Nas algas verdes tem-se basicamente ácido galacturônico, nas algas pardas a fucose e nas algas vermelhas a galactose, que são suas principais unidades de açúcar (Figura 2) (Boney, 1996).



ÁCIDO GALACTURÔNICO



FUCOSE



GALACTOSE

Figura 2: Ilustrações dos três tipos dos principais polissacarídeos presentes nas classes das algas marinhas, a pectina, composto por um polímero de ácidos galacturônicos (algas verdes), a fucana (algas pardas) e a galactose (algas vermelhas). Retirado do site www.fcfar.unesp.br na data de 14/06/13.

As algas marinhas têm despertado grande interesse no ramo da Ciência por serem ricas em polissacarídeos sulfatados e esses possuem várias atividades biológicas já descritas, como anticoagulante e antitrombótica (Souza, 2010).

1.2 Polissacarídeos

Os polissacarídeos fazem parte de um dos quatro grandes grupos de macromoléculas e são amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados inclusive em algas marinhas (Yoon *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2004). Eles são considerados macromoléculas com estrutura complexa, podendo apresentar heterogeneidade, muitos poliânions, o que possibilita a sua ligação a inúmeras proteínas em solução e às vezes ramificação (Arfors *et al.*, 1993). São atribuídos a essas moléculas funções estruturais sendo os seus principais representantes a celulose e a quitina (Figura 3) (Lehninger; Nelson; Cox, 1995).

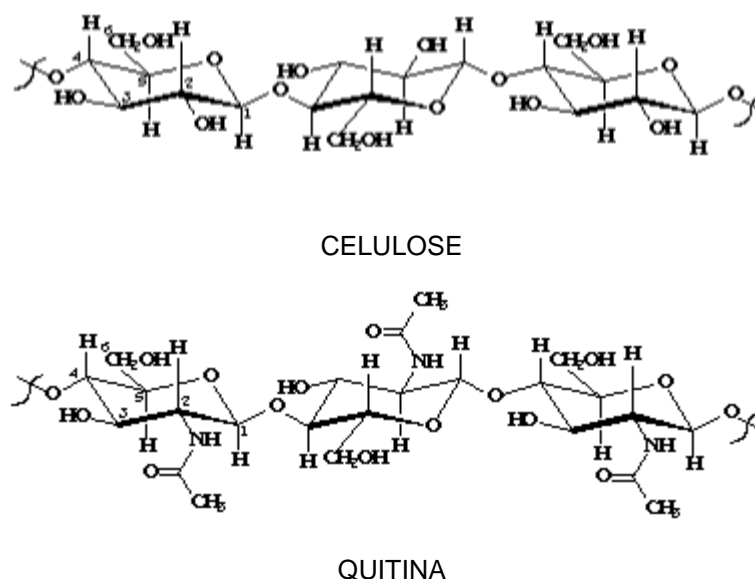


Figura 3: Ilustração da estrutura química de celulose e quitina. Retirado do site www.polymer.com.br na data 15/06/13.

Dentro do grupo dos polissacarídeos, têm-se os polissacarídeos sulfatados, que vem despertando um interesse dentre os pesquisadores por possuírem várias atividades farmacológicas (Boisson-Vidal *et al.*, 1995; Mourão *et al.*, 1996).

1.2.1 Polissacarídeos Sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados podem ser encontrados em todos os filos de animais e acredita-se que eles estejam presentes também em todos os animais, pois exercem funções importantes nos organismos multicelulares (Medeiros *et al.*, 2000).

As algas marinhas também apresentam polissacarídeos sulfatados em sua composição, como citado anteriormente. Todavia, além de estarem presentes naturalmente, esses ainda podem ser sulfatados artificialmente, como o Spirulan, extraído da microalga *Spirulina platensis* (Dore, 2006).

Eles apresentam uma heterogeneidade estrutural devido à presença do grupamento sulfato, podendo este também variar em quantidade, assim como a sua posição. As principais famílias que constituem esta classe são as galactanas sulfatadas, fucanas sulfatadas e os glicosaminoglicanos (Haron-Bouhedja *et al.*, 2000).

1.2.1.1 Polissacarídeos Sulfatados de Algas

Os polissacarídeos sulfatados encontrados nas algas marinhas estão presentes na sua matriz e promovem a sua proteção contra a desidratação por ter um caráter higroscópico (Farias *et al.*, 2008).

Os polissacarídeos sulfatados majoritários das algas pardas são chamados de fucanas. Esses polissacarídeos possuem mais de 90% de α - L-fucose sulfatada na sua constituição (homofucanas) (Figura 4) (Berteau *et al.*, 2003). Apesar de estarem sempre presentes nas algas pardas, as estruturas desses polissacarídeos comumente variam de acordo com a espécie de onde são extraídas. Portanto, a cada extração e purificação de fucanas existe uma alta possibilidade de encontrarmos um composto estruturalmente único fazendo com que este também tenha uma atividade farmacológica única (Dietrich *et al.*, 1995). Essas fucanas também podem possuir monossacarídeos como D-xylose, D-galactose e ácido D-glucurônico sendo, portanto heterogêneas (heterofucanas ou fucoidan), com um padrão de sulfatação irregular (Duarte *et al.*, 2001; Bilan *et al.*, 2004). As fucanas

são caracterizadas na literatura por possuírem diversas atividades farmacológicas, como antivirais, antitumoral, antitrombóticas (Almeida-Lima *et al.*, 2010) e antioxidante (Li *et al.*, 2008). No entanto, a atividade anticoagulante é a mais estudada, visto que a heparina é o anticoagulante de primeira escolha na clínica médica e alternativas ao seu tratamento são bem-vindas devido aos inúmeros efeitos colaterais que sua administração provoca. (Rocha *et al.*, 2005; Barroso *et al.*, 2008).



Figura 4: Estrutura de fucanas sulfatadas. Retirado de Pereira *et al.*, 2002

As algas vermelhas apresentam como monossacarídeo principal a galactose, sendo classificadas como galactanas. Estes polissacarídeos sulfatados são primariamente classificados como agaranas e carragenanas, baseados em sua estereoquímica (Percival *et al.*, 1967). Elas são compostas por unidades alternadas de (1→3) β -D-galactose e (1→4) α -D-galactose, apresentando diferentes graus e posições de sulfatação (Lahaye, 2001) (Figura 5). Entretanto, podem ocorrer variações estruturais nas galactanas, Por exemplo, essas podem apresentar unidades 3,6-anidro- α -L-galactose, além de diferentes graus e posições de sulfatação. Com todas essas variações, esses polissacarídeos permitem a formação de 42 unidades dissacarídicas hipotéticas, sendo que 15 já foram identificadas nessa classe de alga (Stortz *et al.*, 1991).

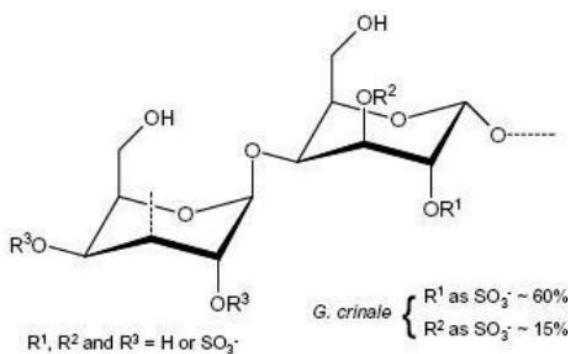


Figura 5: Estrutura química da galactana da alga *G.crinale*. Retirado de Pereira, 2005.

Já as algas verdes possuem um grupo de polissacarídeos sulfatados bastante heterogêneo, pois os mesmos podem possuir galactose, xilose, manose, rafinose, glicose e arabinose (Siddhanta *et al.*, 1999). Mas as unidades mais encontradas são as de *D*-manose e galactose (Ramana *et al.*, 1991). A importância desses polissacarídeos de algas verdes tem sido evidenciada através das atividades biológicas já descritas (Farias *et al.*, 2008).

1.3 Atividade Anticoagulante

A incidência de doenças cardiovasculares vem aumentando consideravelmente nos últimos anos tornando a busca por novos fármacos anticoagulantes cada vez maior. Na tentativa de encontrar um substituto à heparina tem-se testado a atividade anticoagulante e antitrombótica dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, já que estes possuem uma grande variabilidade estrutural, podendo apresentar mecanismos de ação diferentes do da heparina (Rocha, 2005; Mourão *et al.*, 2000).

O modelo fisiológico da cascata de coagulação sanguínea ocorre pela ativação de cada fator da coagulação, que promove a ativação de outros fatores, tendo como consequência a produção de trombina e por fim a formação do coágulo de fibrina. Neste modelo, a coagulação envolve duas vias: intrínseca e extrínseca, sendo que ambas levam à ativação do fator II (Vine, 2009). Para que todas estas reações sejam desencadeadas deve ocorrer a lesão do vaso e assim uma exposição de colágeno e das células que expressam fator tissular. No final dessa cascata de ativações de fatores, o fator Xa ativa a protrombina (fator II) em trombina, e essa converte o fibrinogênio em fibrina formando um coágulo (Figura 6) (Jay *et al.*, 2006).

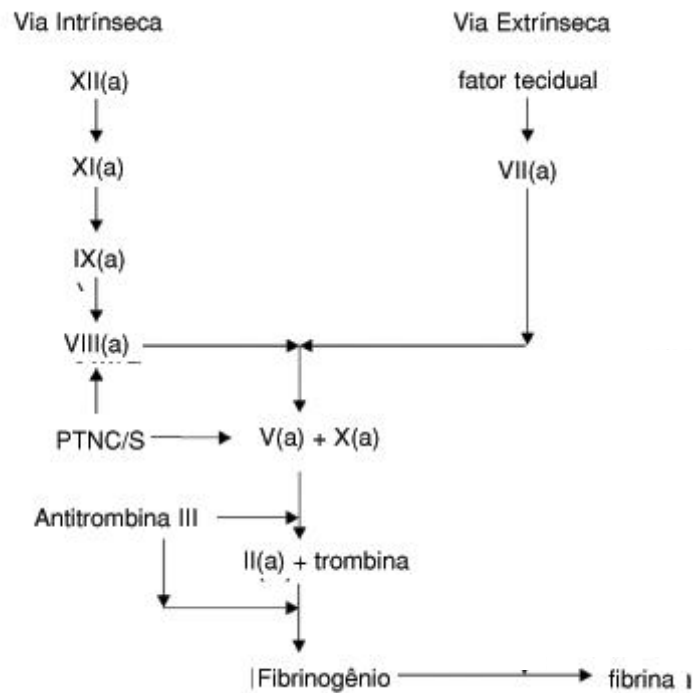


Figura 6: Cascata de coagulação sanguínea. Retirado de Farias *et al.*, 2006.

A heparina é um polissacarídeo linear, altamente sulfatada, com unidades alternadas de α -D-glucosamina e ácido urônico e com ligações do tipo 1 \rightarrow 4. O mecanismo de ação pelo qual a heparina exerce seu efeito anticoagulante ocorre através da antitrombina e do cofator II de heparina. Ela aumenta a afinidade de ambos pela trombina. O sítio de ligação da heparina à antitrombina consiste em uma sequência pentassacarídica (Figura 7) bastante específica, que contém uma unidade responsável por essa ligação, a glucosamina 3-O-sulfatada (Lindahl *et al.*, 1979).

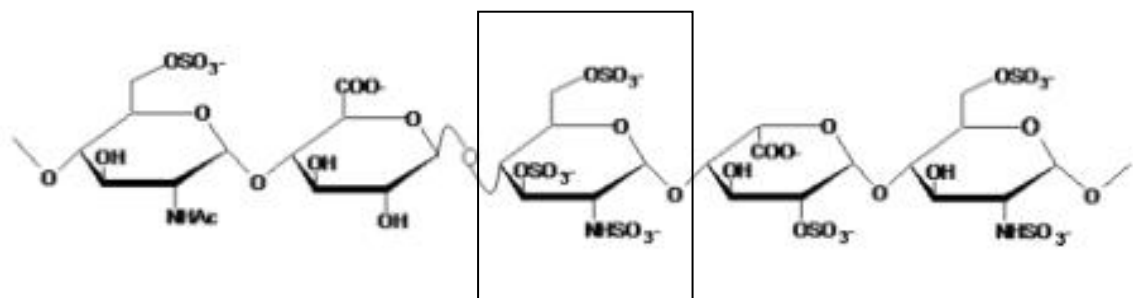
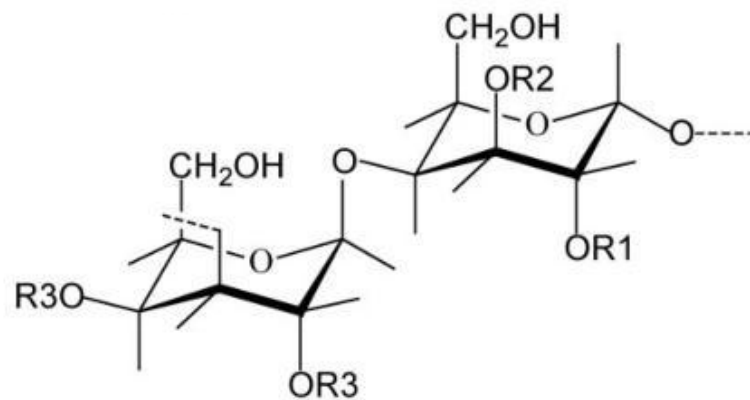


Figura 7: Sequência pentassacarídica específica de ligação da heparina a antitrombina. Retirado de Gracher, 2010 .

A heparina é administrada por via intravenosa, apresentando um efeito imediato, ou pela via subcutânea onde o efeito ocorre de forma mais lenta e a sua duração é dependente da dose administrada. Devido aos efeitos adversos da heparina nativa, foi desenvolvida a de baixo peso molecular, na tentativa de reduzi-los. Porém, foi visto que a mesma, em altas doses, ainda pode gerar riscos ao paciente. (Doutremepuich *et al.*, 1996; Merli, 2005).

Apesar de ser o anticoagulante mais utilizado na clínica médica, a heparina tem vários efeitos colaterais, como o desenvolvimento de trombocitopenia, efeito hemorrágico, ineficácia em deficiências de antitrombina congênitas ou adquiridas, alteração no metabolismo lipídico, dentre outros, por isso torna-se importante o estudo de moléculas que possam vir substituí-la (Trento *et al.*, 2001). Uma característica importante dos polissacarídeos sulfatados é que a sua atividade anticoagulante não está necessariamente ligada ao padrão de sulfatação (Haroun-Bouhedja *et al.*, 2000).

Já existem polissacarídeos provenientes de algas descritos na literatura com atividade anticoagulante. Um exemplo é a D-galactana sulfatada (Figura 8), extraída da alga vermelha *Botryocladia occidentalis*. Seu mecanismo é descrito por potencializar a inibição da trombina e do fator Xa na presença de antitrombina e cofator II da heparina (Farias *et al.*, 2000). Por esse trabalho também foi demonstrado que galactanas dessulfatadas perderam a sua atividade. Portanto o grau de sulfatação destas moléculas é importante. Porém, também foi visto que os polissacarídeos muito sulfatados apresentaram atividade anticoagulante menor que a galactana da *B.occidentalis*. Com isso pode-se concluir que a sulfatação não é uma única exigência para o desempenho dessa função. Além disso, a posição em que o sulfato se encontra possui papel fundamental para obtenção da sua atividade biológica.



$R1, R2 \text{ and } R3 = H \text{ or } SO_3^-$
 $R1 \text{ as } SO_3^- \geq 66 \%$
 $R2 \text{ as } SO_3^- \geq 33 \%$

Figura 8: Estrutura da galactana sulfatada da alga vermelha *B.occidentalis*. Retirado de Melo *et al.*, 2004.

2. JUSTIFICATIVA

A heparina é um polissacarídeo sulfatado extraído principalmente de intestino de porco e pulmão bovino que possui em sua estrutura um pentassacarídeo com padrão de sulfatação específico responsável pelo seu mecanismo de ação. Por ser extraída de animais há um perigo constante quanto a contaminação dos lotes de heparina caso estes animais estejam enfermos, em especial com patologias que poderiam afetar os homens. Com isso, juntamente com o fato da mesma obter muitos efeitos adversos, como hemorragia e trombocitopenia, uma das estratégias na busca de alternativas tem sido a avaliação do potencial anticoagulante de outros polissacarídeos sulfatados, os quais podem ser naturais ou quimicamente modificados (Melo *et al.*, 2004). Neste contexto os polissacarídeos sulfatados de origem marinha se destacam por terem uma menor probabilidade de contaminação por xenobióticos quando comparado aos animais, além do fato das algas serem passivas de cultivo. A alga *P.capitatus* ainda não teve seu potencial biológico prospectado e não se tem nada na literatura sobre a mesma, com isso houve o interesse desse estudo, podendo a mesma vir a ser detentora de um polissacarídeo sulfatado biologicamente ativo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem por objetivo o isolamento e a avaliação da atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha *Penicillus capitatus*.

3.2 Objetivos específicos

- a-) Extrair os polissacarídeos sulfatados da macroalga *P. capitatus*,
- b-) Purificar seus polissacarídeos sulfatados e
- c-) Avaliar a sua atividade anticoagulante em ensaios *in vitro*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Extração dos Polissacarídeos Sulfatados (PS)

Inicialmente a alga *P. capitatus* foi coletada na Praia de Cumuruxatiba (BA) e gentilmente cedida pela mestrandia Thalia Sampaio e pela Profa. Angelica Ribeiro Soares da UFRJ - Campus Macaé ao Laboratório Integrado de Prospecção de Produtos Bioativos chefiado pelo Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli e assim acondicionados em sacos plásticos e estocados à -20°C. Posteriormente, o material foi pesado e triturado para assim ser levado a delipidação em acetona P.A por 24 horas, sem agitação a temperatura ambiente. Então foi retirado o sobrenadante e a alga foi levada a estufa a 60°C até que o material ficasse totalmente seco. Em seguida o tecido seco foi suspenso em tampão digestão (acetato de sódio 0,1 M AcNa, EDTA 5 mM, cisteína 5 mM, pH 5,0) com 10% do seu peso seco em papaína, necessária para a ativação ótima da enzima, por 24 horas em banho-maria a 60°C. Este passo foi realizado até a completa digestão da alga, avaliada através da metacromasia em azul dimetil metileno (DMB). Essa análise foi feita através da mudança de coloração da solução na presença de polissacarídeos sulfatados, que passa da cor azul para a cor rosa devido a complexação do sulfato com o mesmo. No término de cada extração, retirava-se uma alíquota do sobrenadante e adicionava-se 1 mL de DMB. Quando não mais se observou a alteração da cor a extração foi encerrada (Farias *et al.*, 2000).

4.2 Precipitação em etanol dos PS

Os sobrenadantes de cada extração, contendo polissacarídeos totais obtidos através da completa digestão proteolítica, foram reservados e submetidos a precipitações crescentes de etanol P.A. nas seguintes concentrações finais: 10%, 30%, 80%, 150% e 300%. A cada processo de precipitação, o precipitado foi reservado e ao sobrenadante foi adicionado etanol P.A. suficiente para alcançar a concentração final necessária para o próximo passo de precipitação até que se

alcançasse 300% de concentração final de etanol. Logo após, cada precipitado correspondente as frações das precipitações (F10, F30, F80, F150 e F300) era levado a centrifuga clínica por 20 min a temperatura ambiente para a separação total do precipitado. Todos os precipitados, separadamente, foram liofilizados. Após a liofilização o seu peso seco foi anotado e solubilizado em água destilada para posteriores análises (Fernandez *et al.*, 2000)

4.3 Dosagem dos polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados foram quantificados utilizando uma curva padrão construída com condroitim sulfato na presença do corante azul de dimetil metileno (DMB). Este corante possui coloração azul e na presença de polissacarídeos sulfatados sua coloração se altera para um tom lilás/róseo. Para a curva padrão foi utilizado condroitim sulfato na concentração de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e essas soluções foram monitoradas utilizando espectrofotômetro ($A_{525\text{nm}}$). Os valores de absorvância foram anotados e desta forma uma curva foi construída. Somente curvas com $R > 0,99$ foram aceitas.

4.4 Eletroforese em gel de agarose

As frações de polissacarídeos sulfatados foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, como descrito (Dietrich e Dietrich, 1976). O volume ideal a ser utilizado em cada poço do gel de agarose foi estimado misturando-se volumes crescentes da solução da amostra a 1 mL de DMB até que a solução adquirisse tom róseo. As amostras foram aplicadas num gel de agarose 0,5 %, preparado em tampão 1,3 diaminopropano acetato 0,05 M (pH 9,0). O gel foi submetido a 100 V por 1 h. Os polissacarídeos sulfatados no gel foram fixados por 12 h com Cetavlon 0,1 % em água destilada. 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).

4.5 Teste de tempo de tromboplastina parcialmente ativada (aPTT)

O aPTT é um ensaio de coagulação que utiliza plasma humano normal proveniente do banco de sangue do Hospital universitário do Fundão – Rio de

Janeiro. O plasma humano foi coletado em uma solução de citrato de sódio 3,8% na proporção de 9:1 e analisado pelo tempo de tromboplastina parcialmente ativada (aPTT). Para as análises de aPTT foi utilizado como controle positivo, heparina (193 UI/mg). Neste ensaio, 90 μ L de plasma foram incubados com 10 μ L de soluções com diferentes concentrações de polissacarídeos sulfatados ou heparina e NaCl 0,9%. Logo após, 100 μ L de cefalina ativada (Reagent Celite, Biolab, Mérieux) foi adicionado à mistura e incubado por mais 2 minutos. Em seguida, 100 μ L CaCl_2 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 Cromatografia de troca iônica

Os polissacarídeos sulfatados liofilizados foram solubilizados em tampão de equilíbrio (Tris-HCl 20 mM, EDTA 50 mM em pH 7,4) e foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE celulose equilibrada e percolada com o mesmo tampão equilíbrio. Após essa etapa, os polissacarídeos sulfatados não retidos foram lavados até a sua completa remoção. Posteriormente, os polissacarídeos sulfatados ligados à matriz cromatográfica foram eluídos com o mesmo tampão na presença de NaCl em diferentes concentrações (0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 M) em gradiente de “step-wise” ou em degraus. As frações recolhidas foram monitoradas através da propriedade metacromática usando o azul de dimetil metileno (DMB) a $A_{525\text{nm}}$.

As frações de PS obtidas foram dialisadas exaustivamente contra a água destilada, concentradas por liofilização e armazenadas até a realização dos ensaios (Farndale *et al.*, 1986).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os polissacarídeos sulfatados extraídos por digestão proteolítica foram precipitados em concentrações crescentes de etanol, com o intuito de separá-los.

Estas foram dosadas através de uma curva utilizando condroitim sulfato como padrão (Tabela 1), e em seguida submetidas à eletroforese em gel de agarose (Figura 9). De acordo com a dosagem, pode-se observar que a fração F80 é a mais rica em polissacarídeos sulfatados, seguidas da F150, F30, F300 e F10. Também pode-se criar uma relação entre a quantidade de polissacarídeo sulfatado extraído entre as frações. Com isso, pode-se observar que a F80 representou 31,4 % dos polissacarídeos extraídos da macroalga *P.capitatus*, sendo que o peso inicial utilizado da alga de 40g. Através da eletroforese em gel de agarose observou-se que as frações F150 e F300 têm um padrão de migração similar, assim como as frações F30 e F80, sendo que a F30 apresenta uma banda polidispersa, podendo indicar polissacarídeos diferentes sendo extraídos na mesma fração. A F10 apresentou um padrão de migração diferente dos demais, o que indica fortemente uma fração contendo polissacarídeos sulfatados altamente heterogêneos.

Tabela 1: Dosagem dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *P. capitatus* das frações extraídas por precipitação em concentrações crescentes de etanol.

| Frações precipitadas com etanol | Polissacarídeo sulfatado na fração/ polissacarídeo sulfatado total (%) | Polissacarídeo sulfatado (mg) |
|--|---|--------------------------------------|
| F10 | 2 | 31,3 |
| F30 | 21,3 | 329,1 |
| F80 | 31,4 | 486,4 |
| F150 | 28,1 | 435,6 |
| F300 | 17,2 | 265,2 |

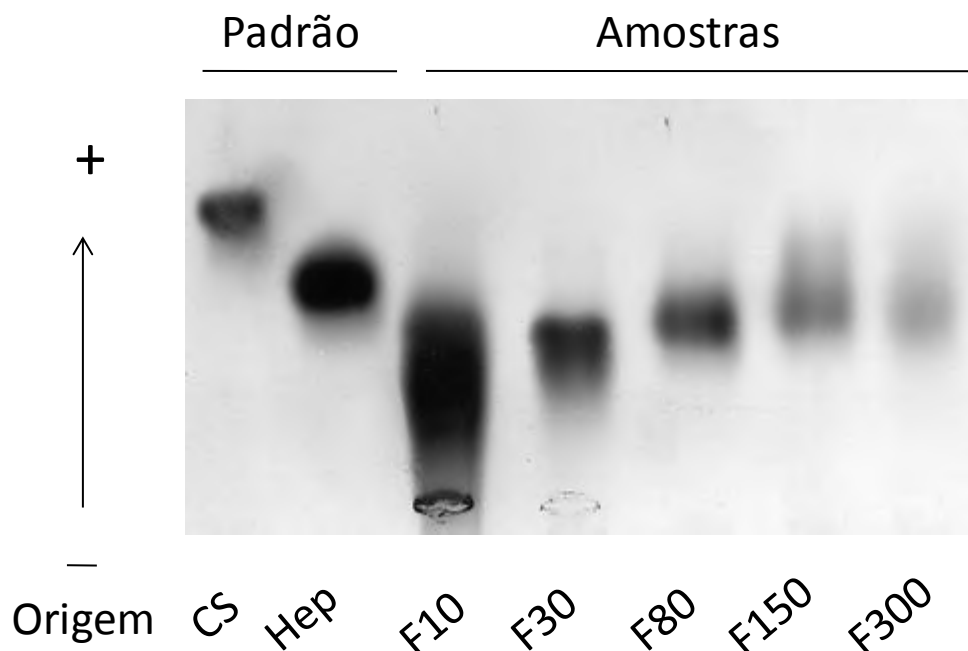


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose das frações ricas em polissacarídeo sulfatado do extrato precipitado em concentrações crescentes de etanol da alga marinha *Penicillus capitatus*. Eletroforese em gel de agarose das frações provenientes de precipitações crescentes de etanol (F10, F30, F80, F150 e F300) comparado aos padrões (heparina e condroitin sulfato). As frações foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,5% por 1h a 110V em 1,3- diaminopropano/benzina (pH 9.0). Os PS foram fixados com solução brometo de cetil trimetil amônio 0.1%. Após 12h, o gel foi lavado e corado utilizando-se azul de toluidina 0.1% e posteriormente foi lavado com solução ácido acético/etanol/H₂O (0.1:5:5,v/v). Legenda: CS, condroitin sulfato ; HEP, heparina ; F10, fração 10% ; F30, fração 30%; F80, fração 80%; F150, fração 150%; F300, fração 300%.

Após realizar a dosagem e o gel de eletroforese de cada fração precipitada foi realizado o teste de aPTT para avaliar sua atividade anticoagulante (Figura 10). Pode-se observar que as frações que obtiveram maior atividade anticoagulante foram as frações F30 e F80.

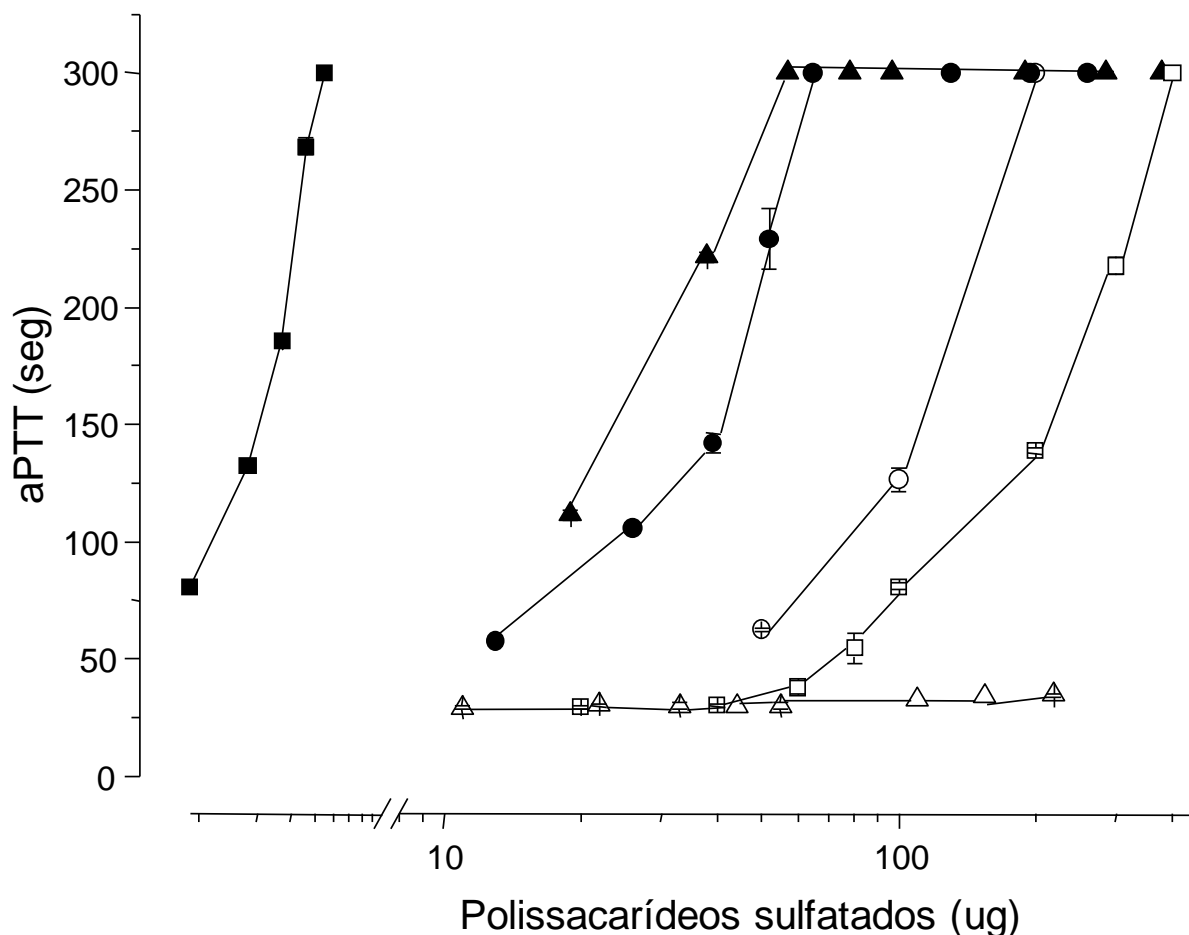


Figura 10: Atividade anticoagulante das frações polissacarídicas F10 (círculos abertos), F30 (círculos fechados), F80 (triângulos fechados), F150 (quadrados abertos) e F300 (triângulos abertos), obtidas por precipitação com concentrações crescentes de etanol da alga *P.capitatus*, realizados segundo o teste de aPTT, utilizando como padrão a heparina (quadrados fechados)

As frações F30 e F80 alcançaram o tempo máximo mensurado nesse teste (300 seg) em baixas concentrações de polissacarídeo sulfatado comparado as demais frações e principalmente pelo fato dessas frações não estarem purificadas. Isso é um forte indicativo que após o processo de purificação dessas duas frações (F30 e F80) poderíamos atingir uma atividade específica maior. Por isso inicialmente submeteu-se a fração F30 a uma cromatografia de troca iônica (figura 11).

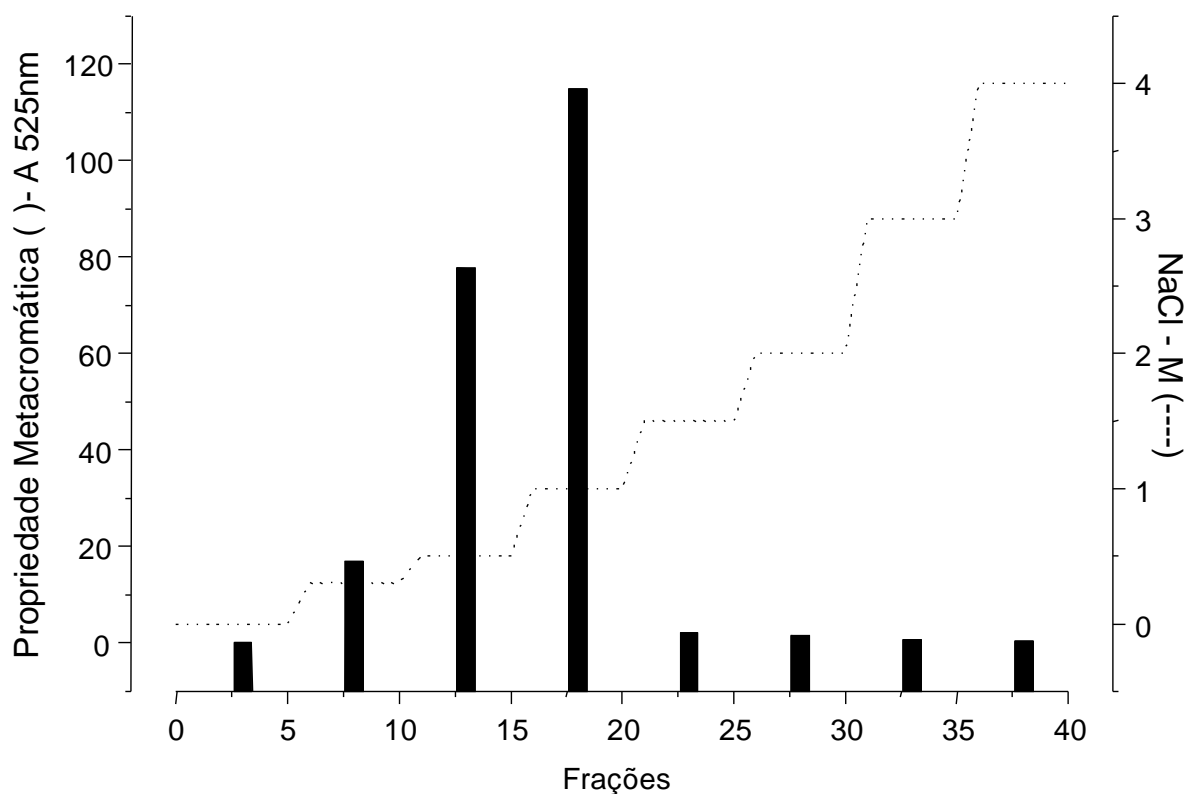


Figura 11: Cromatograma dos polissacarídeos da F30 extraídos da alga marinha *Penicillus capitatus* em cromatografia de troca iônica (DEAE – celulose). A coluna foi equilibrada e lavada com tampão EDTA 50 mM e Tris-HCl 20 mM. Os polissacarídeos sulfatados foram eluídos com o mesmo tampão contendo NaCl em diferentes concentrações (0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0, 3,0 e 4,0 M). Os polissacarídeos sulfatados foram monitorados (A_{525nm}) por meio da propriedade metacromáticas com azul de dimetilmetileno.

De acordo com a cromatografia pode-se observar que o material eluiu em 0,5M e 1,0M de NaCl. Com isso os polissacarídeos precipitados na mesma porcentagem de etanol foram separados através da cromatografia, deixando o material mais puro, sendo que o polissacarídeo majoritário da fração eluiu na concentração de 1,0M. Também foi realizada uma eletroforese em gel de agarose das frações obtidas a partir dessa cromatografia, com o intuito de observar o seu padrão de migração das mesmas (Figura 12).

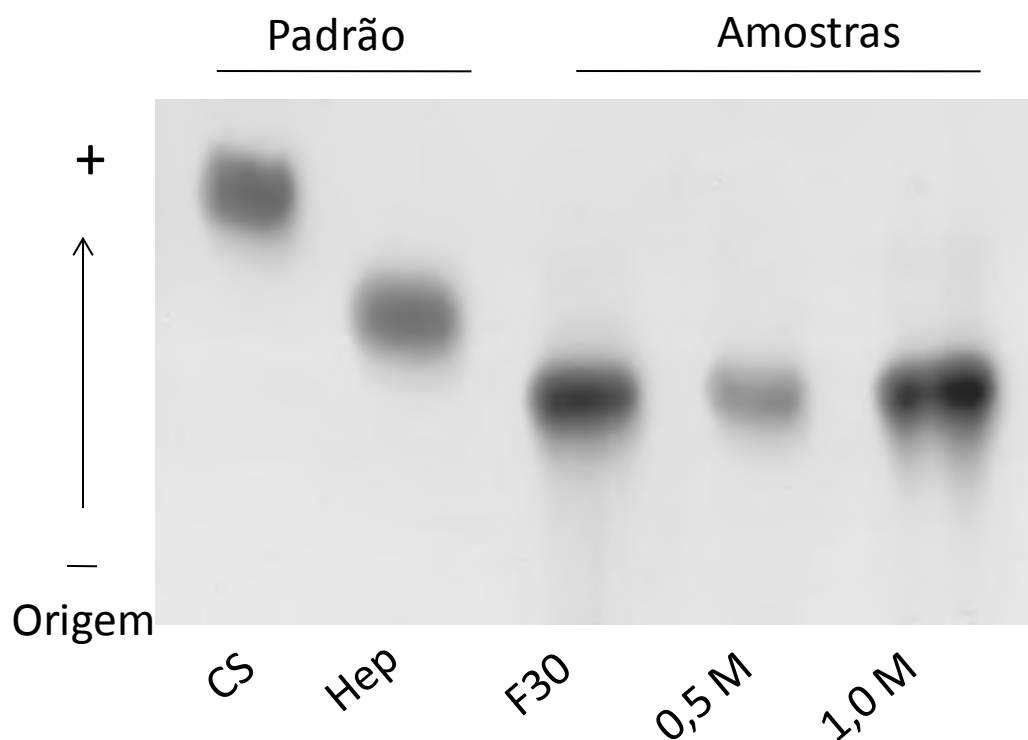


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose das frações ricas em polissacarídeo sulfatado obtidos através da cromatografia de troca iônica da F30 da alga marinha *Penicillus capitatus*. Eletroforese em gel de agarose das frações provenientes da cromatografia de troca-iônica (0,5M e 1,0M) e do extrato bruto da F30 comparado aos padrões (heparina e condroitin sulfato). As frações foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,5% por 1h a 110V em 1,3- diaminopropano/benzina (pH 9.0). Os PS foram fixados com solução brometo de cetil trimetil amônio 0.1%. Após 12h, o gel foi lavado e corado utilizando-se azul de toluidina 0.1% e posteriormente foi lavado com solução ácido acético/etanol/H₂O (0.1:5:5,v/v). Legenda: CS, condroitin sulfato ; HEP, heparina ; F30, fração 30% ; 0,5 M, fração 0,5 Molar; 1,0 M, fração 1,0 Molar.

Através da eletroforese pode-se observar que os polissacarídeos que eluíram em 0,5 e 1,0 M possuem mobilidade similar e migraram abaixo da heparina, o que sugere um grau de sulfatação parecido ou superior.

A fração F80 também obteve um resultado relevante no teste de aPTT com o extrato bruto, que foi realizado inicialmente, por isso esta também foi submetida a uma cromatografia de troca iônica (Figura 13).

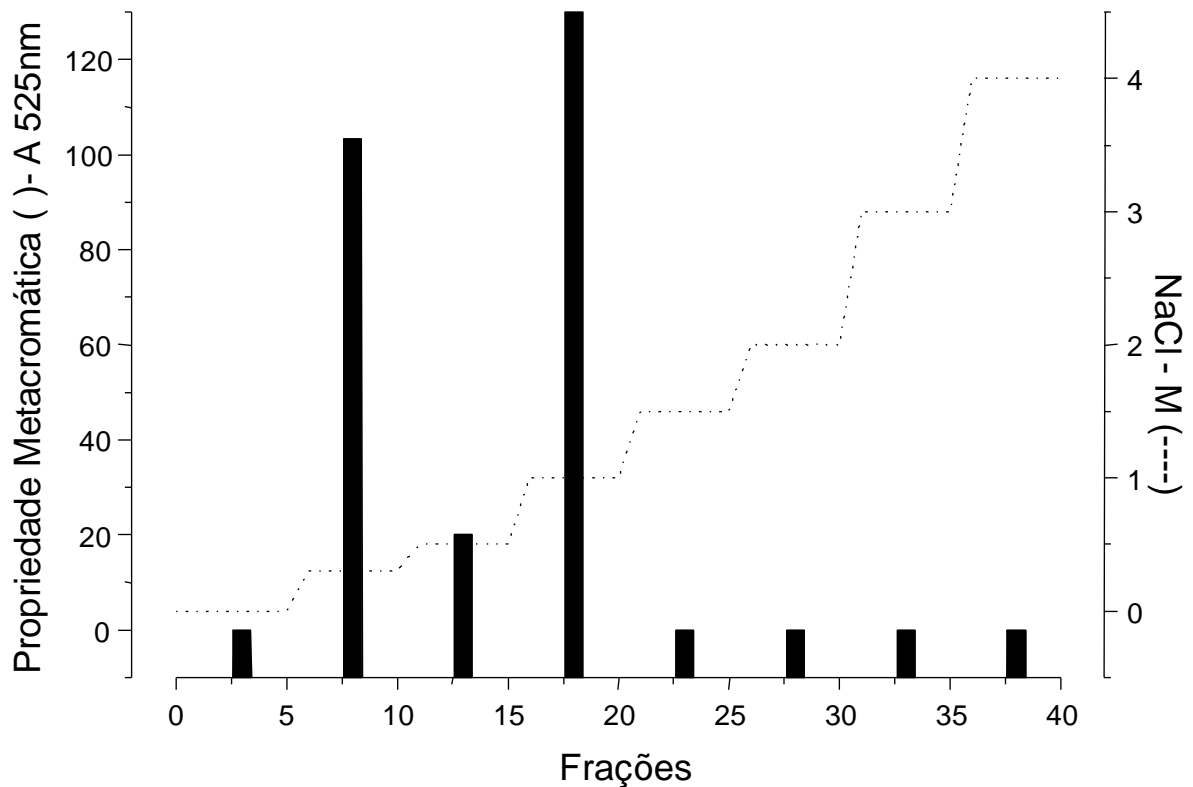


Figura 13: Cromatograma dos polissacarídeos da F80 extraídos da alga marinha *Penicillus capitatus* em cromatografia de troca-iônica (DEAE – celulose). A coluna foi equilibrada e lavada com tampão EDTA 50 mM e Tris-HCl 20 mM. Os polissacarídeos sulfatados foram eluídos com o mesmo tampão contendo NaCl em diferentes concentrações (0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0, 3,0 e 4,0 M). Os polissacarídeos sulfatados foram monitorados (A525nm) por meio da propriedade metacromáticas com azul de dimetilmetileno.

Através da cromatografia da F80 observou-se que os polissacarídeos sulfatados eluíram em três molaridades distintas, 0,3, 0,5 e 1,0 M, sendo majoritariamente eluídos em 0,3 e 1,0M. Portanto, novamente, os polissacarídeos da mesma fração precipitada eluíram em concentrações diferentes, o que indica que o material foi purificado. Para caracterizá-los, os mesmos, foram aplicados em um gel de eletroforese (Figura 14).

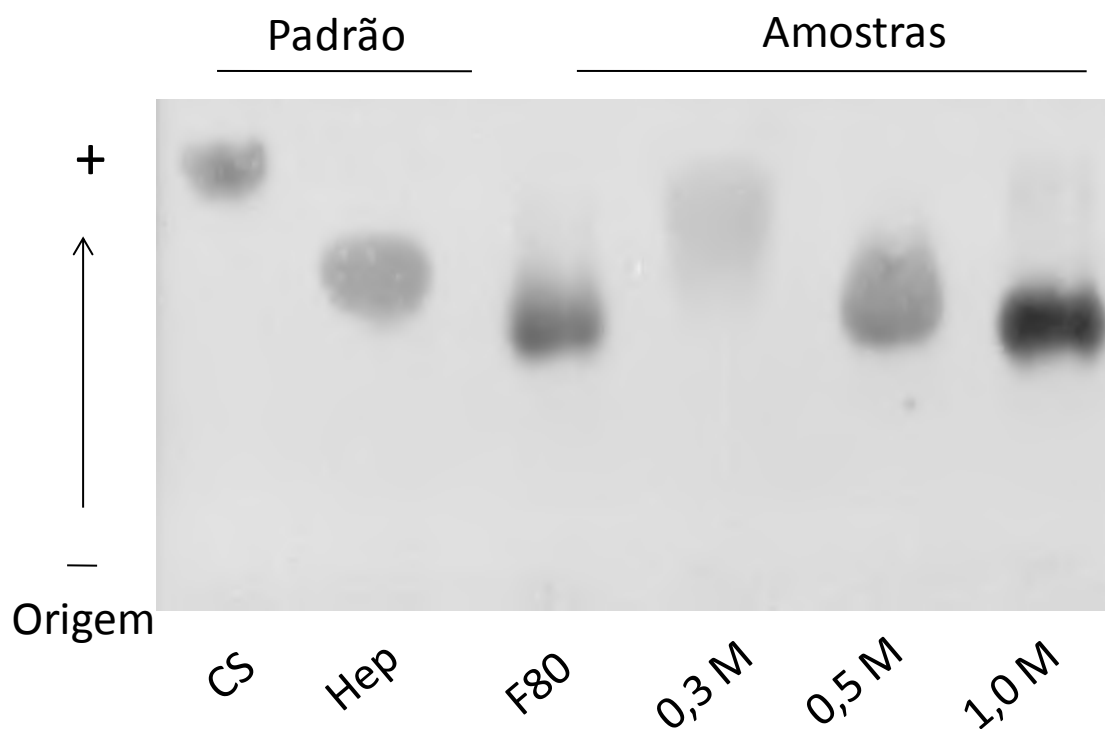


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose das frações ricas em polissacarídeo sulfatado obtidos através da cromatografia de troca iônica da F80 da alga marinha *Penicillus capitatus*. Eletroforese em gel de agarose das frações provenientes da cromatografia de troca-iônica (0,3M, 0,5M e 1,0M) e do extrato bruto da F80 comparado aos padrões (heparina e condroitin sulfato). As frações foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,5% por 1h a 110V em 1,3- diaminopropano/benzina (pH 9.0). Os PS foram fixados com solução brometo de cetil trimetil amônio 0.1%. Após 12h, o gel foi lavado e corado utilizando-se azul de toluidina 0.1% e posteriormente foi lavado com solução ácido acético/etanol/H₂O (0.1:5:5,v/v). Legenda: CS, condroitin sulfato ; HEP, heparina ; F80, fração 80% ; 0,3 M, fração 0,3 Molar; 0,5 M, fração 0,5 Molar; 1,0 M, fração 1,0 Molar.

Com a eletroforese em gel de agarose das frações cromatografadas da F80 percebe-se que os padrões de migração dos três materiais aplicados no gel são distintos. A fração F80 0,3 M apresenta uma banda que migra entre o condroitin sulfato e a heparina. Enquanto que a banda da fração 0,5 M co-migra com a heparina e, por fim, a banda da fração 1,0 M apresenta um padrão de migração abaixo da heparina. Estes resultados sugerem que existem três polissacarídeos sulfatados distintos nessa mesma fração, por terem eluídos em concentrações

diferentes na cromatografia e por terem um padrão de migração também diferente na eletroforese.

Em seguida, realizou-se novamente o teste de aPTT das frações obtidas através da cromatografia de troca iônica (DEAE – Celulose) da F30 (Figura 15) e F80 (Figura 16), com o objetivo de avaliar a atividade anticoagulante dessas frações purificadas separadamente.

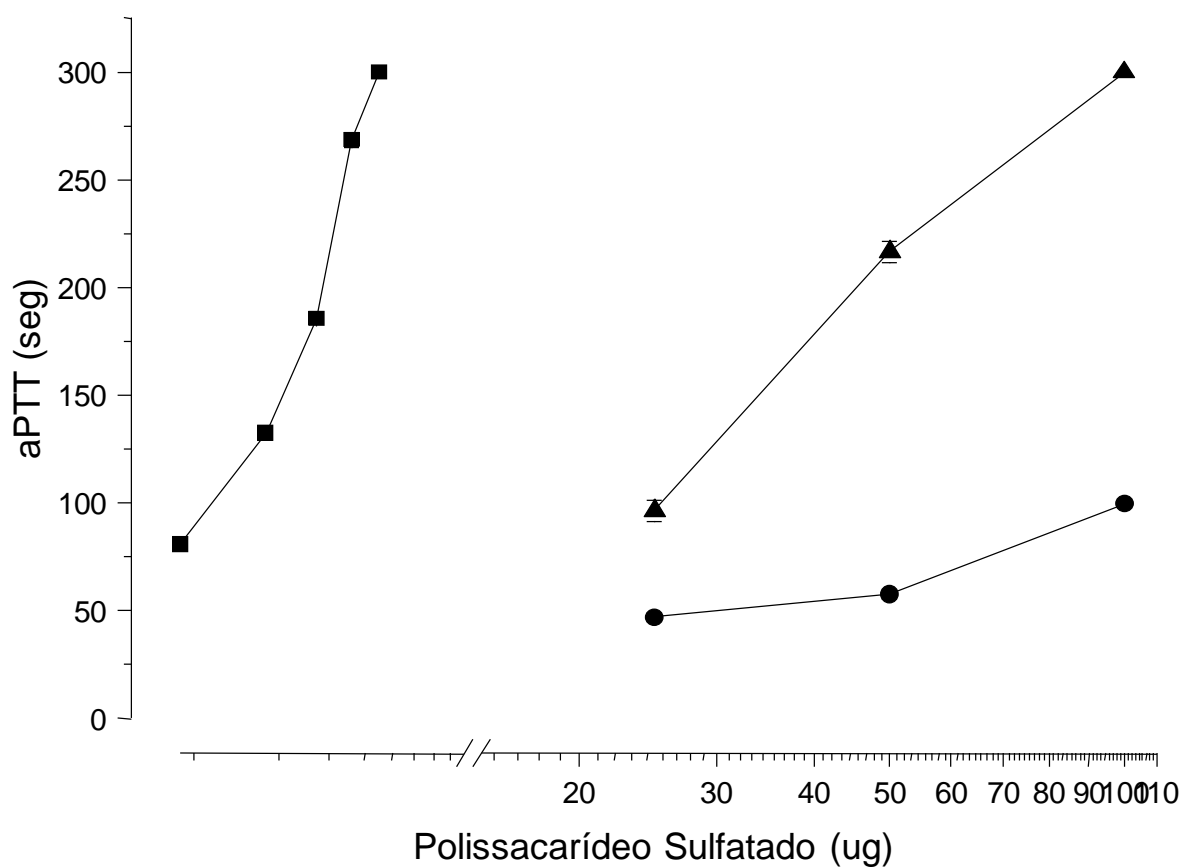


Figura 15: Atividade anticoagulante das frações 0,5 M (círculos fechados) e 1,0 M (triângulos fechados) obtidas por cromatografia de troca iônica (DEAE - Celulose) da F30 da macroalga *P. capitatus*, realizados segundo o teste de aPTT, utilizando como padrão a heparina (quadrados fechados).

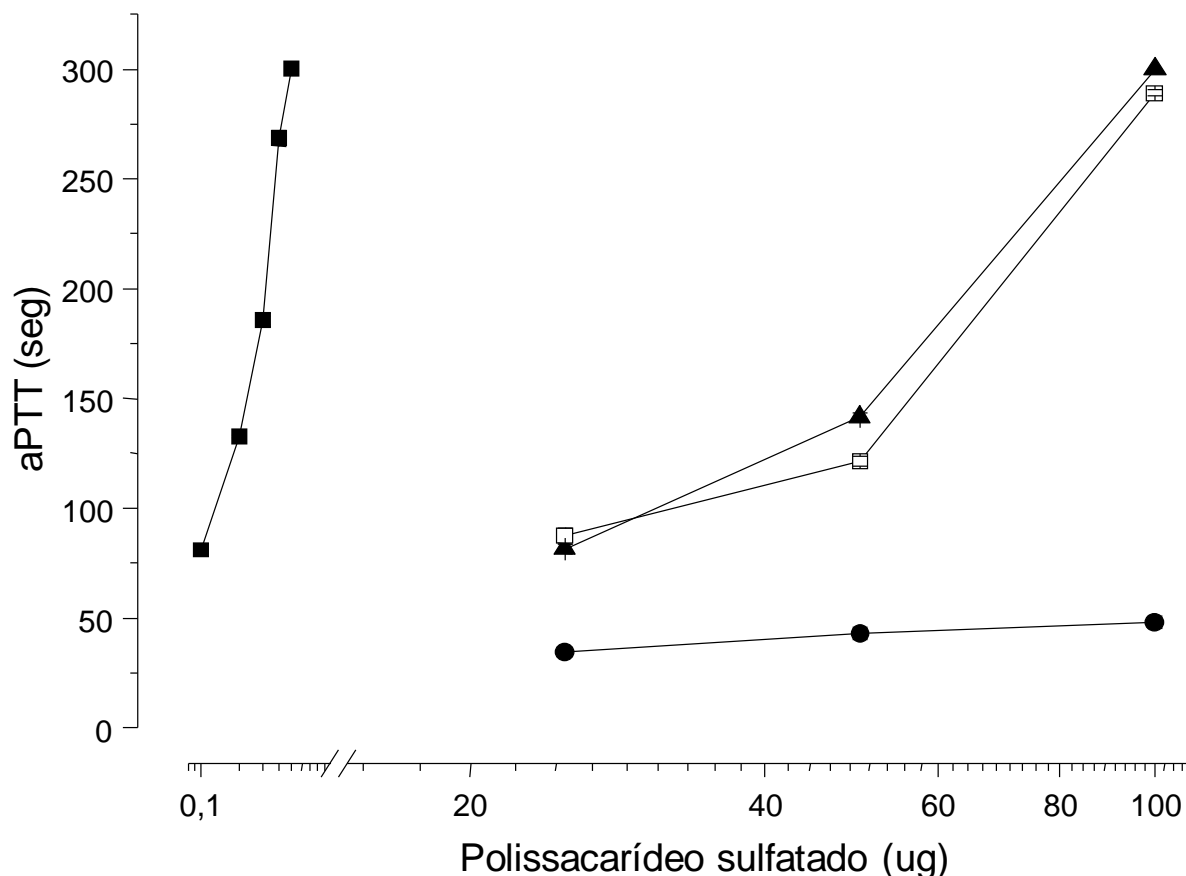


Figura 16: Atividade anticoagulante das frações 0,3 M (círculos fechados), 0,5 M (triângulos fechados) e 1,0 M (quadrados abertos) obtidas por cromatografia de troca iônica (DEAE - Celulose) da F80 da macroalga *P. capitatus*, realizados segundo o teste de aPTT, utilizando como padrão a heparina (quadrados fechados).

Ao realizar o teste de aPTT com as frações da cromatografia pode-se observar que a atividade coagulante continuou relevante. No resultado obtido através das frações cromatografadas da F30 vê-se que a 0,5M possui uma atividade anticoagulante menor que a 1,0M. E nos resultados das frações cromatografadas da F80 observa-se que tanto a 0,5 M e 1,0M também apresentam atividade anticoagulante. Esses resultados de aPTT, F30/ F30 1,0M e F80/ F80 0,3, 0,5 e 1,0M, foram realizados somente uma vez, portanto necessitam de repetição para a sua confirmação, visto que as frações cromatografadas obtiveram uma atividade menor do que os seus respectivos extratos brutos. Esse resultado pode sugerir um sinergismo dos polissacarídeos sulfatados presentes na mesma fração, pois após a cromatografia a sua atividade anticoagulante diminuiu.

6. CONCLUSÕES

Os polissacarídeos sulfatados isolados da alga marinha *P. capitatus* apresentaram atividade anticoagulante. Isso foi comprovado através das atividades de cada fração que foi testada. Pode-se observar que modificou-se acentuadamente a atividade anticoagulante entre as frações precipitadas em etanol, possivelmente em razão da diversidade estrutural dessas moléculas. Acredita-se que através dos mecanismos de ação envolvidos na coagulação será possível esclarecer tal fato. Foi visto também que as frações 1,0M da F30 e 0,5M da F80 mantiveram a atividade anticoagulante porém em uma concentração maior quando comparado ao extrato bruto das mesmas. Isso será mais investigado para saber se há cooperação dos materiais que foram purificados com os reagentes no processo de coagulação sanguínea.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida-Lima, J., Costa, L. S., Silva, N. B., Silveira, R. F. M., Silva, F. V., Felipe, M. B. M. C., Batistuzzo, S. R., Leite, E. L., Rocha, H. A. O. Evaluating the possible genotoxic, mutagenic and tumor cell proliferation-inhibition effects of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan. *JAT. Journal of Applied Toxicology*, v. 30, p. 708-715, 2010.

Aquino, R. S., Landeira-Fernandes, A. M., Valente, A. P., Andrade, L. R., Mourão, P. A. S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. *Glycobiology*, 15(1), 11-20, 2005.

Arfors, K. E., Ley, K. Sulfated polysaccharides in inflammation. *J Lab Clin Med*. v. 121, p. 201-202, 1993.

Barroso, E. M. A. et al... A non anticoagulant heterofucan has antithrombotic activity in vivo. *Planta Medica*, [S.l.], v. 74, p. 712-718, 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*, v.13, p. 29-40, 2003.

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.

Boney, A.D., *A biology of marine algae*, Hutchinson Ltd., New York, p.216, 1966.

Dietrich, C. P., Farias, G. G. M., Abreu, L. R. D., Leite, E. L., Silva, L. F., Nader H. B. A new approach for characterization of polysaccharides from algae: Presence of four

main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. *Plant Sci.*, 108, 143-153, 1995.

Dietrich, C. P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochem. Biophys. Acta*, 1475, 1-8, 2000.

Dore, C. M. P. G. Estudo de β -glucanas extraídas dos fungos *Geastrum saccatum* e *Polyporus dermoporus*: características químicas e atividades biológicas. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRN, Natal, 2006.

Doutremepuich, C., Azougagh Oualane, F. Doutremepuich, F. & Fareed, J. New class of heparin derivatives with a potent antithrombotic effect and a very limited hemorrhagic activity. *Throm. Resear.* 83(3): 217-228, 1996.

Duarte, M. E. R., Cardoso, M. A., Nosedá, M. D., Cerezo, A. S. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr Res.*, v. 333, p. 281-293, 2001.

Farndale, R.W., Buttle, D.J., Barrett, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 883, n. 02, p. 173-177, 1986.

Fernandez, A.M., Aiello, K.R., Aquino, R.S., Silva, L.C., Reis, L., Mourão, P.A.S., 2000, A sulfated polysaccharide from the sarcoplasmic reticulum of sea cucumber smooth muscle is an endogenous inhibitor of the Ca^{+2} -ATPase, *Glycobiology*

Farias, W. R. L.; Valente, A. P.; Pereira, M. S.; Mourão, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. *J Biol Chem*, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

Farias, M., Cruz, L., Clapauch, R., Siqueira, C., Efeitos da terapia estrogênica transdérmica isolada ou associada à progesterona micronizada nos fatores de

coagulação em mulheres menopausadas com e sem sobrepeso. *Arq Bras Endocrinol Metab* vol.50 no.3 São Paulo June, 2006

Farias, E.H., Pomin, V.H., Valente, A.P., Nader, H.B., Rocha, H.A., Mourão, P.A.S. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. *Glycobiology*. v. 18,n. 3, p. 250-259, 2008.

Gracher, A.H.P., Avaliação do potencial anticoagulante e antitrombótico de polissacarídeos nativos e quimicamente sulfatados de basidiomicetos. Tese apresentada ao curso de PósGraduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências-Bioquímica. Orientadores: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin Prof. Dr. Marcello Iacomini, 2010.

Haroun-Bouhedja, F., Mostafa, E., Siquin, C., Boisson-Vidal, C. Relation between sulfato groups and biological activities of fucans. *Thromb. Res.* 100, 453-459, 2000

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

Haroun-Bouhedja, F.; Mostafa, E.; Siquin, C.; Boisson-Vidal, C. Relation between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thromb Res* v. 100, p. 453-459, 2000.

Jay, R. M., Liu, P. L. How anticoagulants work. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management*, v. 30, p. 30-39, 2006.

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. Fucoïdan: structure and bioactivity. *Molecules*, v. 13, p. 1671–1695, 2008.

Lindahl, U., Bäckström, G., Höök, M., Thunberg, L., Fransson, L. A., Linker, A. Structure of the antithrombin-binding site in heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 76(7), p. 3198–3202, 1979.

McHugh, J. D. A guide to the seaweed industry – FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER 441. School of Chemistry, University of New South Wales and Australian Defence Force Academy Canberra. ROME. 2003

Merli, G. Diagnostic assessment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Amer. J. Med.*, v. 118 (8), p. 3-12, 2005.

Medeiros, G. F., Mendes, A., Castro, R. A. B., Baú, E. C., Nader, H. B., Dietrich, C. P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochem. Biophys. Acta*, 1475, 1-8, 2000.

Melo, F.R., Pereira, M.S., Foguel, D., Mourão, P.A.S., Antithrombin-mediated Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides: different mechanisms for heparin and sulfated galactans., *Vol. 279, No. 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 nº.2 São José do Rio Preto Apr./June 2008*

Mourão, P. A. S., Pereira, M. P., Pavão, M. S. G., Mulloy, B., Tollefsen, D. M., Mowinckel, M., Abildgaard, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfato form echinoderm. *J. Biol. Chem.*, 271, 23973-23984, 1996.

Mourão, P. A.; Pereira, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends. Cardiovasc. Med.*, v. 9(8), p. 225-232, 2000.

Mulloy, B.; Mourão, P. A. S.; Gray, E. Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. *J Biotechnol*, v. 77, p. 123-135, 2000.

Pereira, R., Kraemer, G., Yarish, C., Sousa-Pinto, I. (2008). Nitrogen uptake by gametophytes of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) under controlled culture conditions. *European Journal of Phycology*, 43(1): 107-118.

Percival, E. G. V., Mac Dowell, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. London: Academic Press, 219, 1967.

Pereira, M.S., Melo, F.R., Mourão, P.A.S., Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans?. *Glycobiology* vol. 12 no. 10 pp. 573–580, 2002.

Pereira, M. G. et al. 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.

Pereira, R., Yarish, C., Sousa-Pinto, I. The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture*, 252: 66-78, 2006.

Ramana, K.S., Rao, E.V., Structural features of the sulphated polysaccharide from a green seaweed, *Cladophora socialis*. *Phytochemistry*, v. 30, n. 1, p. 259-262, 1991.

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. et al. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schröderi*. An ideal antithrombotic agent? *Journal of Biological Chemistry*, [S.I.], v. 280, p. 41278-41288, 2005

Rodrigues, J.A.G., Farias, W.R.L., Purificação e atividade anticoagulante in vitro de galactanas sulfatadas extraídas da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*, Revista Brasileira de Engenharia de Pesca 3(2), jul. 2008

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 Biol Macromol., 26(2-3), 151-4. 1999.

Souza, A.S.S., Galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux: respostas na inflamação e nocicepção. Dissertação Apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas. Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy., 2010

Stortz, C.A.; Cerezo, 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.

Trento, F.; Cattaneo, F.; Pescador, R.; Porta, R.; Ferro, L. Antithrombin Activity of an Algal Polysaccharide. Trombosis Research, v. 102, p. 457-456, 2001.

Van Den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. Algae - An introduction to phycology. United Kingdom, Cambridge University Press. 1995

Vine, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. Retina, v. 29, p. 1-7, 2009.

Yoon, S., Pereira, M. S., Pavão, M. S. G., Hwang, J., Pyung, Y., Mourão, P. A. S. The medial plant *Porana Volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. Tromb Res, v. 106, p. 51-58, 2002.