



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ - PROF. ALUÍSIO TEIXEIRA
CURSO DE FARMÁCIA



ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DA GALACTANA SULFATADA EXTRAÍDA DA
MACROALGA MARINHA *PENICILLUS CAPITATUS*.

CAROLINE NOGUEIRA FARIA

MACAÉ

2016

CAROLINE NOGUEIRA FARIA

Título : Ação anticoagulante da galactana sulfatada extraída da alga marinha *Penicillus capitatus*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como um dos requisitos para obtenção do título de

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli

Macaé

Janeiro/2016

CIP - Catalogação na Publicação

N778a Nogueira Faria, Caroline
Ação anticoagulante da galactana sulfatada
extraída da macroalga marinha *Penicillus
Capitatus*. / Caroline Nogueira Faria. -- Rio de
Janeiro, 2016.
50 f.

Orientador: Leonardo Paes Cinelli.
Coorientadora: Thamyris Almeida Moreira.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade
de Farmácia, Bacharel em Farmácia, 2016.

1. *Penicillus Capitatus*. 2. Ação
Anticoagulante. 3. Alga marinha. 4. Estrutura
química. 5. polissacarídeo sulfatado. I. Paes
Cinelli, Leonardo, orient. II. Almeida Moreira,
Thamyris, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom e maravilhoso Deus, fonte inesgotável de amor e minha inabalável fortaleza, por ter me dado o dom da vida e por ter me proporcionado, com Sua infinita misericórdia, a realização de um dos maiores sonhos da minha vida. Mais uma promessa se cumpriu!!

Aos meus pais, Valdeni e Natalice, por terem me dado todo suporte, amor e por terem sido meu porto-seguro durante todo esse tempo. Pai, obrigada por ter sempre acreditado em mim, por todo investimento, por ter me dado palavras de encorajamento e mansidão nos momentos que eu mais precisei, meu amor por você é além do que eu possa imaginar e expressar. Mami, obrigada por exatamente tudo, por ter me acompanhado no dia da minha inscrição na faculdade e ter comemorado juntamente comigo com tantas lágrimas o começo dessa etapa linda da minha vida. Te agradeço por ter sido minha amiga, companheira e ajudadora..por ter me amparado quando achei que não tivesse mais saída e também quando pensava em desistir. Obrigada por toda força, te amo pra sempre.

As minhas irmãs, Aline e Camille por terem sido tão companheiras e melhores amigas ao longo de toda essa jornada.. Agradeço a vocês por se orgulharem tanto de mim, sem vocês minha vida não faria o menor sentido. “ Irmãs por acaso, amigas por opção”. Muito obrigada mesmo! Eu amo vocês.

As minhas tias, tios, primos e primas, avô e avó por todo apoio e amor de sempre. Não poderia deixar de ressaltar em especial meus tios e tias : Valci e mãe Vanilda, Tia Joselma (meu dói rs), Tia Dedéia , meu irmão Pedro e Tia Sandrinha.

A vontade de Deus nem sempre é a nossa e é baseado nisso que registro a minha saudade e infinita gratidão pela passagem das minhas avós Mafía e Ormi pela minha vida. Sei que mesmo não sendo possível que vocês vejam esse sonho concretizado, eu via o quanto torciam e oravam pela realização dele e o quanto estariam orgulhosas de me ver formada. Vocês fizeram total diferença na minha vida, serei eternamente grata.

Ao meu orientador Prof. Dr Leonardo Paes Cinelli, deixo registrada toda minha admiração. Sou grata por ter apostado em mim, por ter passado todo seu conhecimento de forma tão paciente, pelo incentivo, por ter me feito ter paixão tão grande pela ciência. Agradeço por todas as longas conversas e por estar sempre disposto a me ajudar. Tenho absoluta certeza que sem ele, não conseguiria concluir esse trabalho.

As minhas amigas e companheiras de laboratório, Jé, Regina, Bianca, Kassila, Maihara, Rayssa e Caroll pelo incentivo diário, que tiveram uma participação extraordinária na conclusão desse trabalho. Em especial, a minha “miga maravilhosa” e co-orientadora Thamyris, por todas as incansáveis vezes que me ajudou, por ter ficado comigo até tarde da noite no laboratório para fazer experimentos ou escrever meu TCC, sem a sua ajuda eu sei que seria muito mais difícil. Obrigada por ter despertado, juntamente com o Léo, esse meu amor pelo que faço. Te agradeço pela amizade, pelo companherismo, cumplicidade e por ser quem você é pra mim dentro e fora do laboratório. Te amo, migaa. Rs

Aos meus amigos e amigas que conheci durante a graduação, em especial, Caroll e Livia por terem sido minhas companheiras durante todos esses anos.

Não poderia deixar de agradecer a minha amiga Manu por ter me encorajado e por ter embarcado junto comigo nessa profissão tão linda e digna. Obrigada, a por ter sido minha grande amiga nesses 10 anos de amizade. Amo você

Aos meus amigos de Rio das Ostras, também a toda igreja Porta do Céu por terem intercedido tanto pela minha vida e por estarem felizes pela minha vitória.

Aos nossos colaboradores, a mestranda Thalia Sampaio e a Profa. Angélica Ribeiro Soares que nos cederam a alga e ao Gustavo e a Bianca que nos ajudaram em alguns experimentos.

À banca por ter aceito ao meu convite e participado da conclusão dessa fase, contribuindo diretamente na finalização do projeto.

Ao CNPq e FAPERJ pelos convênios e auxílios concedidos, assim como a CEPRUS, pela parceria com a UFRJ, e é onde nosso laboratório está localizado.

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos ao desafio. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes. Porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as coisas; só nos obriga a sermos conscientes. Problemas para vencer, liberdade para provar. E, enquanto acreditarmos no nosso sonho, nada é por acaso.” (Henfil)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 : Ilustração mostrando as 3 classes de algas.

Figura 2 : Distribuição da espécie *Penicillus capitatus*.

Figura 3 : Imagem da alga *Penicillus capitatus*.

Figura 4 : Ilustração da estrutura química da quitina e celulose.

Figura 5 : Estrutura do polissacarídeo sulfatado extraído do ouriço do mar *L. variegatus*.

Figura 6: Estrutura representativa da galactana de algas vermelhas.

Figura 7 : Estrutura de fucoidans de *Chorda filum* e *Fucus vesiculosus*.

Figura 8: Diagrama do mecanismo da coagulação.

Figura 9: Sequência pentassacarídica específica de ligação da heparina a antitrombina.

Figura 10: Estrutura da galactana sulfatada da alga vermelha *B.occidentalis*.

Figura 11 : Imagem da alga verde *P. capitatus*.

Figura 12: Local de coleta da alga

Figura 13: Imagem da Praia de Cumuxuratiba- BA.

Figura 14: Diagrama do processo de precipitação dos PS.

Figura 15 : Cinética de extração de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha *P. capitatus*

Figura 16 : Extração de PS totais das extrações da alga *P. capitatus*.

Figura 17 : Eletroforese em gel de agarose da extração de PS da alga marinha *P. capitatus*

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose das frações ricas em polissacarídeos sulfatados do extrato precipitado em concentrações crescentes de etanol

Figura 19: Atividade anticoagulante das frações (teste de aPTT)

Figura 20 : Atividade do tempo de protrombina das frações (PT)

Figura 21: Cromatograma dos polissacarídeos da F23 extraídos da alga marinha *Penicillus capitatus*

Figura 22: Cromatograma dos polissacarídeos da F44 extraídos da alga marinha *Penicillus capitatus* em cromatografia de troca-iônica (DEAE – celulose)

Figura 23: Eletroforese em gel de agarose das frações ricas em polissacarídeo sulfatado obtidos através da cromatografia de troca iônica da F23 da alga marinha *Penicillus capitatus*.

Figura 24: Eletroforese em gel de agarose das frações ricas em polissacarídeo sulfatado obtidos através da cromatografia de troca iônica da F44 da alga marinha *Penicillus capitatus*.

Figura 25: Efeito da fração PF23 e PF44 na inibição do fator Xa por AT

Figura 26: Efeito da fração PF23 e PF44 na inibição da trombina por AT

Figura 27: Análise de infravermelho dos polissacarídeos sulfatados da fração P F23 extraídos da alga *P.capitatus*.

Figura 28: Cromatografia gasosa do PS (PF44) proveniente da alga *P.capitatus*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Peso seco das diferentes frações precipitadas antes e após a diálise

Tabela 2: Dosagem dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *P capitatus* das frações extraídas por precipitação em concentrações crescentes de etanol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura	Nome em português	Abreviatura advinda do inglês
aPTT	tempo de tromboplastina parcialmente ativada	<i>Activated partial thromboplastin time</i>
PT	Tempo de protrombina	<i>Prothrombin Time</i>
CG	cromatografia gasosa	
CS	condroitim sulfato	
Cetavlon	brometo de cetil trimetil amônio	<i>Hexadecyltrimethylammoniumbromide</i>
DMB	1,9 azul de dimetil metileno	<i>1,9 dimethyl methylene blue</i>
EB	extrato bruto	
EDTA	ácido etilenodiamino tetraacético	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
F9	fração precipitada na concentração final de 9% de etanol	
F23	fração precipitada na concentração final de 23% de etanol	
F44	fração precipitada na concentração final de 44% de etanol	
F75	fração precipitada na concentração final de 75% de etanol	
Fuc	Fucose	
Gal	Galactose	
Glu	Glicose	<i>Glucose</i>
HBMM	heparina de baixo peso molecular	
Hep	Heparina	
P1F23	fração precipitada na	

	concentração final de 30% de etanol cromatografada em DEAE-celulose	
P1F44	fração precipitada na concentração final de 80% de etanol cromatografada em DEAE-celulose	
PS	polissacarídeo sulfatado	
Sbn	Sobrenadante	
TRIS	2-amino-2-hidroximetil propano- 1,3 - diol	- 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane- 1,3-diol

SUMÁRIO

1	Introdução.....	14
1.1	Algas marinhas.....	14
1.1.1	Algas Verdes.....	16
1.1.2	A espécie <i>Penicillus capitatus</i>	16
1.2	Polissacarídeos.....	17
1.2.1	Polissacarídeos sulfatados.....	18
1.2.1.1	Polissacarídeos sulfatados de algas	19
1.3	Sistema de Coagulação	22
1.3.1	A Trombose e o papel dos polissacarídeos no sistema de coagulação.	24
1.3.2	Heparina.....	25
1.3.3	Galactana sulfatada da alga <i>Botryocladia occidentalis</i>	25
2.	Justificativa.....	27
3	Objetivos.....	28
3.1	Objetivos gerais.....	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
4.	Materiais e Métodos.....	29
4.1	Coleta e preparo do material.....	29
4.2	Extração dos polissacarídeos sulfatados.....	31
4.3	Determinação do tempo de extração dos polissacarídeos sulfados.....	31
4.4	Precipitação em etanol dos polissacarídeos sulfados	31
4.5	Dosagens.....	32

4.5.1 Dosagem de Ácido Urônico.....	32
4.5.2 Dosagem de hexose.....	33
4.5.3 Dosagem de proteína.....	33
4.6 Eletroforese em gel de agarose.....	33
4.7 Testes de coagulação.....	34
4.7.1 Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (aPTT).....	34
4.7.2 Tempo de protrombina (PT).....	34
4.8 Cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE – celulose.....	34
4.9 Ensaio de inibição da trombina ou fator Xa.....	35
4.10 Espectroscopia de infravermelho.....	35
4.11 Análise monossacarídica do polissacarídeo sulfatado por cromatografia gasosa (GC).....	35
4.12 Análise Estatística	36
5. Resultado e discussão.....	37
5.1 Tempo de Extração dos polissacarídeos sulfatados.;.....	37
5.2 Precipitação dos polissacarídeos totais.....	40
5.3 Dosagem bioquímica.....	41
5.4 Eletroforese em gel de agarose das frações precipitadas.....	42
5.5 Atividade anticoagulante das frações precipitadas.....	43
5.6 Cromatografia de troca iônica da F23 e F44.....	46
5.7 Ensaio enzimáticos com as frações purificadas.....	51
5.8 Análise por infravermelho da P F23 e P F44.....	53
5.9 Análise por cromatografia gasosa da fração P F44.....	55

6 Conclusões.....	56
7.Referências Bibliográficas.....	57

RESUMO

As algas marinhas são fontes reconhecidas de polissacarídeos sulfatados (PS) e suas propriedades farmacológicas têm atraído grande interesse nas Ciências Farmacêuticas. Uma das atividades que se destacam é a anticoagulante. Isso é devido à grande variedade estrutural que cada espécie de alga é capaz de biossintetizar. Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial anticoagulante dos PS extraídos da alga *Penicillus capitatus*. Resumidamente, nesse trabalho os PS dessa alga foram extraídos, parcialmente caracterizados e seu mecanismo de ação foi avaliado. Nossos resultados apontam a necessidade de oito extrações proteolíticas consecutivas para que não seja detectável PS no sobrenadante, que o tempo ideal de cada extração é de 90 minutos e quando essa metodologia é realizada sob agitação ela é até 18 vezes mais eficiente que sob a forma estática. Após as digestões proteolíticas todas foram unidas (chamada de extrato bruto; EB) devido ao fato de apresentarem a mesma mobilidade eletroforética. A partir disso, o EB foi submetido a precipitações cumulativas em etanol P.A nas seguintes concentrações (9%, 23%, 44%, 60% e 75%), denominadas, respectivamente por, F9, F23, F44, F60, F75. Em todas estas frações precipitadas foi determinado o conteúdo de hexoses totais, ácido urônico e proteína. Os resultados obtidos em eletroforese mostraram que as frações obtidas por precipitação seletiva com etanol apresentaram migração mais lenta do que a heparina, sugerindo alto grau de sulfatação. Nos ensaios de coagulação as frações F44 e F23 demonstraram atividade anticoagulante satisfatório e por essa razão aprofundamos nossos estudos nestas duas frações. A partir desse dado, ambas foram submetidas à cromatografia de troca-iônica (DEAE-celulose), com o objetivo de purificar seus PS analisados em eletroforese. Após isso, os ensaios enzimáticos mostraram que ambas as frações exercem seu mecanismo de ação através da antitrombina/Xa. Os ensaios estruturais realizados até o presente momento apontam que esse PS se trata de uma galactana sulfatada.

Palavras-chave : alga marinha, *Penicillus capitatus*, polissacarídeo sulfatado, galactana sulfatada, ação anticoagulante

1. INTRODUÇÃO

1.1 Algas Marinhas

As algas marinhas, também conhecidas taxonomicamente como *Algae*, que em latim significa “ervas marinhas” constituem um grande e diversificado grupo de espécies autotróficas, ou seja, que produzem energia necessária ao seu metabolismo através da fotossíntese. Devido a sua grande produção de oxigênio molecular, são responsáveis pela estruturação da atmosfera terrestre, desta forma, contribuindo para a manutenção de diversas espécies, inclusive algumas com importância econômica e social (Vidotti e Rollemberg, 2004; Van den Hoek, 1995; Horta, 2000).

As algas formaram um importante recurso para os seres humanos desde tempos pré- históricos, usadas principalmente na dieta alimentar (Dillehay et al., 2008; Apud Craigie, 2010). Há milênios estes organismos aquáticos são empregados, principalmente por povos orientais, como alimento e medicamento (Chapman e Chapman, 1980,;Lembi e Waaland, 1988; Apud Craigie, 2010). Com o passar dos anos foram feitos estudos a fim de descobrir outras aplicações, dentre essas novas áreas da pesquisa, destaca-se a indústria de processamento alimentar, biotecnologia e medicina.

As algas marinhas são capazes de sintetizar uma variedade de compostos como: carotenóides, terpenos, clorofilas, vitaminas, aminoácidos, carragenanas, alginatos, entre outros (Paniagua et al., 2009). Dentre esses, também estão os polissacarídeos sulfatados (PS) que apresentam importantes atividades farmacológicas (Molinski et al., 2009) como: antimicrobiana (Trouvelot et al., 2008; Santos e Wagner, 2010; Vera et al., 2011), antiviral (Cirne-santos et al., 2006; Soares et al., 2007; Souza et al., 2007), antiofídica (Moura et al., 2010), citotóxica, antituberculósica (Azevedo et al., 2008), anti-inflamatória, antiangiogênica, antiadesiva (Cumashi et al., 2007) e anticoagulante/antitrombótica (Mourão et al., 1996; Mourão e Pereira, 2000; Melo et al., 2004; Albuquerque et al., 2004; Melo e Mourão, 2008; Melo et al., 2012).

As algas marinhas podem ser classificadas de acordo com a coloração, que compõe três principais classes: clorofíceas (algas verdes), feofíceas (algas pardas) e rodofíceas (algas vermelhas).

O que diferencia as diferentes espécies é a composição da sua parede celular. Nas algas verdes tem-se basicamente ácido galacturônico, nas algas vermelhas a galactose, nas algas pardas a fucose, como principais unidades de açúcar (Figura 1). A celulose está presente em todas as classes, no entanto, pode estar associada à pectina ou ao alginato (Boney,1966).

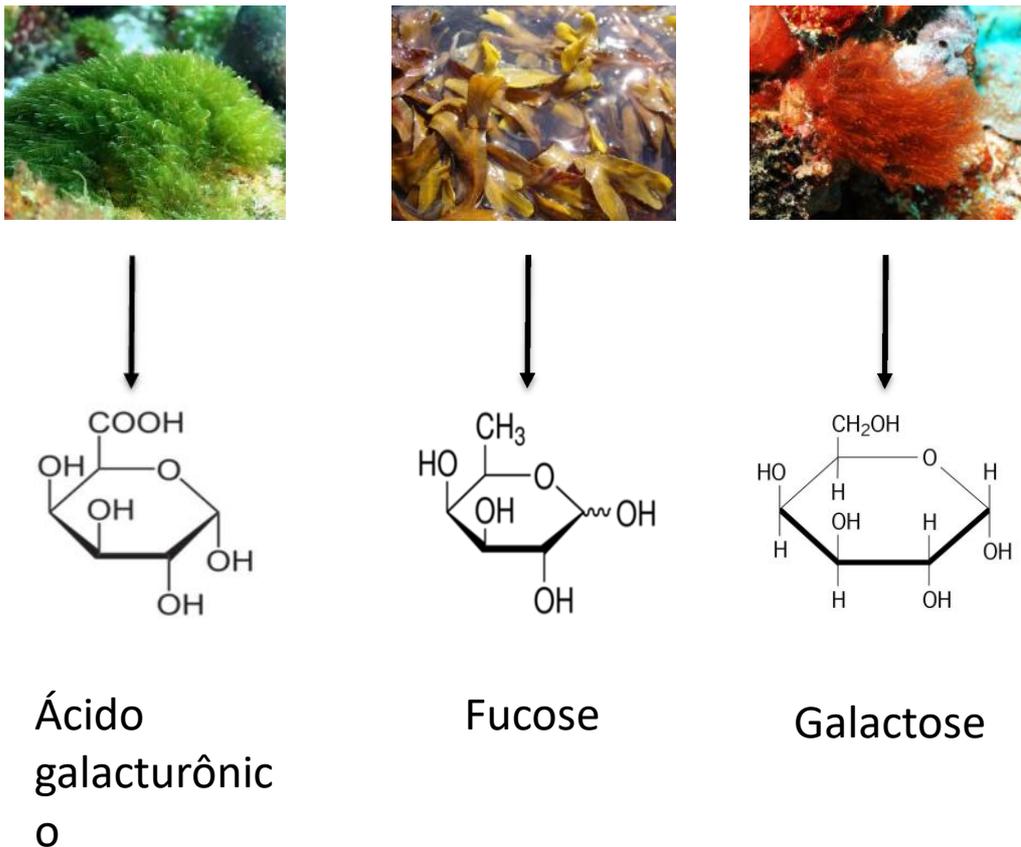


Figura 1 : Ilustração mostrando as 3 classes de algas marinhas e suas respectivas principais unidades de açúcares (algas verdes, algas marrons e algas vermelhas).

Atualmente, a sistemática vegetal foi revolucionada pela aplicação de ferramentas moleculares. Entretanto, foi evidenciada a existência de agrupamentos filogeneticamente não relacionados e que tiveram que ser realocados em grupos taxonômicos distintos (filos, ordens, famílias, etc.), ou em novos grupos criados para acomodar organismos de origens filogenéticas diferentes. Segundo Adl et al., (2005), as algas podem ser classificadas em grupos de organismos procariotos (cianobactérias) e eucariotos, que estão divididos em três grandes grupos: *Chromalveolata*, *Archaeplastida* e

Excavata, porém, essa nova classificação ainda se encontra muito precoce de acordo com a literatura (Sina et al., 2005),

1.1.1 Algas Verdes

As algas verdes possuem essa coloração devido à clorofila em maior parte das células (Bold et al., 1985). Suas células possuem parede celular de celulose e reservam amido em seu interior, e contêm os pigmentos clorofilas *a* e *b*, carotenos e xantofilas. Podem ser unicelulares flageladas e não-flageladas, coloniais móveis e não-móveis, algas filamentosas e algas formando lâminas celulares. São extremamente abundantes nos ambientes aquáticos, onde é um dos mais importantes componentes do fitoplâncton.

1.1.2 *Penicillus capitatus*

A alga verde *Penicillus capitatus* é encontrada em águas rasas ao longo do Mar do Caribe, Bahamas, Flórida e Bermuda (Taylor et al., 1960), sendo que no Brasil está localizada na região Nordeste (Figura 2).

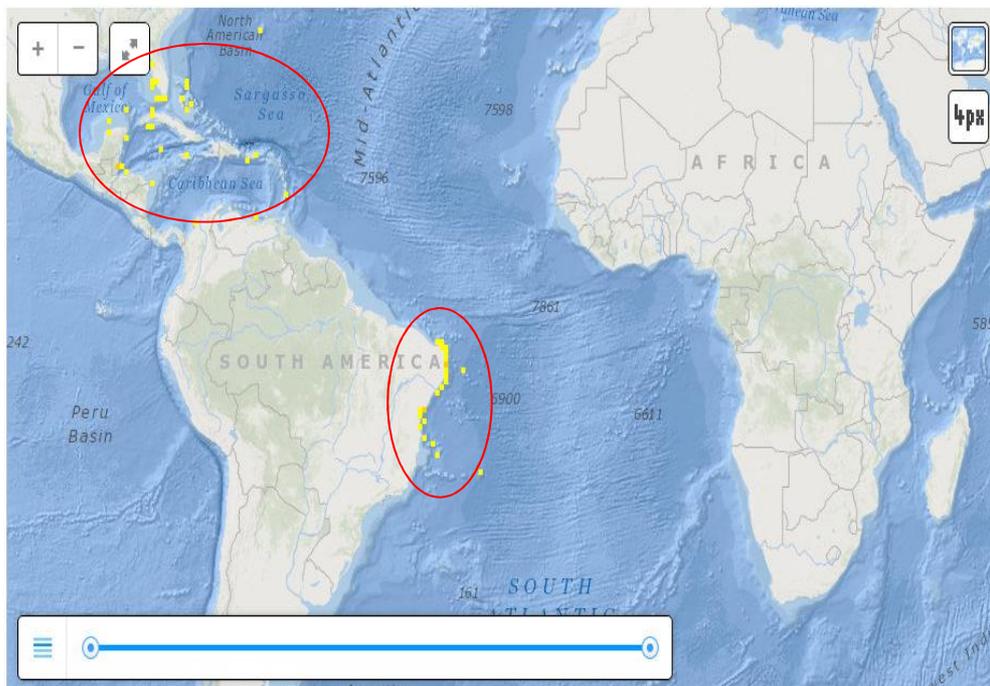


Figura 2 : Distribuição da espécie *Penicillus capitatus*. Retirado do site <http://eol.org/pages/967711/maps> em 27/10/2015.

Seu comprimento é de aproximadamente 15 cm de altura e são cenocíticas. O talo (o "corpo" da alga) é levemente calcificado, dando-lhe cor verde esbranquiçada, exceto para as pontas extremas dos filamentos, que pode ser verde brilhante. Ele consiste de uma haste, ancorada na areia ou lama por uma massa de rizóides, e um tufo de terminais de filamentos livres (Figura 3) (Hillson 1977; Abbott e Dawson 1978). Os tufos filamentosos medem de 2 a 4 cm de comprimento. A vida da alga *Penicillus capitatus* é de aproximadamente 45 dias de acordo com Wefer, 1980 (citado em Wilson e Ramsook, 2007).



Figura 3: Imagem da alga *Penicillus capitatus*. Retirado do site: <http://www.arpat.toscana.it/> em 27/10/2015.

1.1 Polissacarídeos

A maioria dos carboidratos encontrados na natureza ocorre como polissacarídeos, polímeros de média a alta massa molecular. Sendo amplamente distribuídos na natureza, fazem parte de um dos quatro grandes grupos de macromoléculas (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 (Arfors e Ley, 1993). São atribuídos a essas moléculas funções estruturais sendo os seus principais representantes a celulose e a quitina (Figura 4) (Lehninger; Nelson; Cox, 1995).

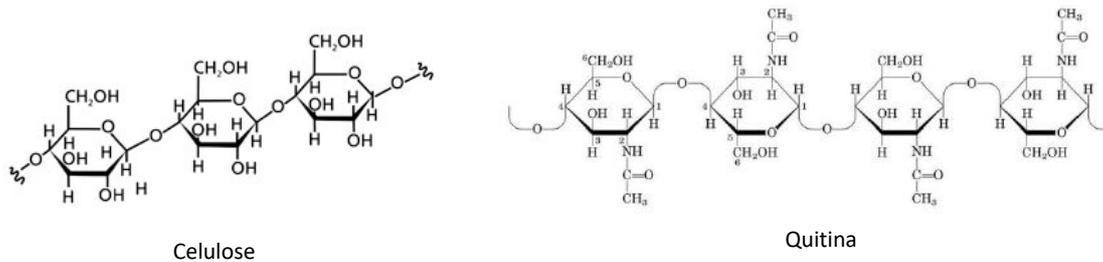


Figura 4 : Ilustração da estrutura química das principais moléculas encontradas nos polissacarídeos. Retirado do site : <http://www2.iq.usp.br> em 17/11/2015.

Dentre os grupos dos polissacarídeos, estão os PS que tem atraído grande interesse dos pesquisadores devido as suas atividades farmacológicas já descritas (Mourão et al., 1996).

1.1.1 Polissacarídeos sulfatados

Polissacarídeos sulfatados são macromoléculas complexas que apresentam alta densidade de cargas negativas, devido à presença de ésteres de sulfato e, em alguns casos, grupamentos carboxila. Muitas das propriedades funcionais desses polímeros são atribuídas ao seu caráter polianiônico (Aquino et al., 2010). Eles apresentam heterogeneidade estrutural devido as possibilidades de açúcares constituintes, à presença do grupamento sulfato, podendo este também variar em quantidade, assim como a sua posição (Figura 5).

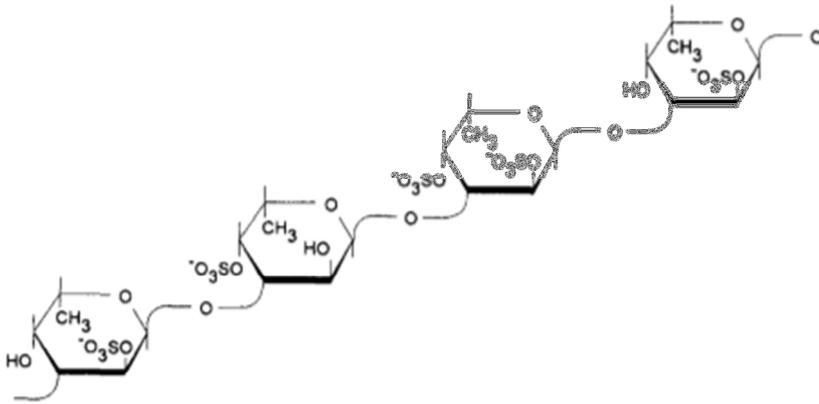


Figura 5 : Estrutura do polissacarídeo sulfatado extraído do ouriço do mar *L. variegatus*, mostrando as unidades de açúcar repetitivas com a presença de grupos sulfato. Retirado de Mulloy et al., 1994.

Os polissacarídeos sulfatados (principalmente, carragenanas e fucoidanas) estão presentes na parede celular e nos espaços intercelulares de algas marinhas como componentes estruturais (Percival e Mc Dowel, 1967). As principais famílias que constituem esta classe são as galactanas sulfatadas, fucanas sulfatadas e os heteropolissacarídeos (Haron-bouhedja et al., 2000).

Esses polímeros geralmente apresentam sulfatações nessas unidades, que, junto com o grupo carboxila presente no ácido hexurônico, lhes conferem uma alta densidade de carga negativa. Essa propriedade permite que esses polissacarídeos interajam com vários tipos de moléculas, como: fatores de crescimento, citocinas, enzimas, proteínas de superfície celular, proteínas plasmáticas, entre outros (Mulloy e col., 2005; Kjellén e col., 1991).

No tocante à sua distribuição, os PS podem ser encontrados no tecido conjuntivo de vertebrados na forma de glicosaminoglicanos (Mathews et al., 1975), em menor quantidade nos em invertebrados (Mourão et al., 1995) e em grande quantidade nas algas marinhas na forma de galactanas e fucanas sulfatadas (Percival et al., 1967).

1.1.1.1 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). Muito embora, essa função seja

apropriada para diversas espécies que habitam regiões em que ficam expostas diretamente ao sol, somente esta explicação não responde a todas as demais espécies que ficam submersas durante todo seu ciclo de vida.

Os PS, assim como os demais polissacarídeos, podem apresentar uma heterogeneidade estrutural, porém esta se demonstra mais acentuada quando comparada às dos polissacarídeos neutros, carboxilados ou dos fosforilados, já que pode ocorrer variação no grau e na posição de substituição (Boisson-Vidal et al., 1995; Haroun-Bouhedja et al., 2000).

Os PS majoritários de algas vermelhas possuem grande importância comercial e são amplamente utilizados na indústria de alimentos devido as suas propriedades reológicas como agentes gelificantes e espessantes, possuem majoritariamente em sua estrutura como monossacarídeo principal a galactose, sendo classificadas como galactanas (Percival et al., 1967) . Esses PS são principalmente classificados como agaranas e carragenanas que são compostas por unidades alternadas de (1→3) β-D-galactose e (1→4) α-D-galactose, apresentando diferentes grau e posição de sulfatação (Figura 6) (Lahaye, 2001; Stortz et al., 1991).

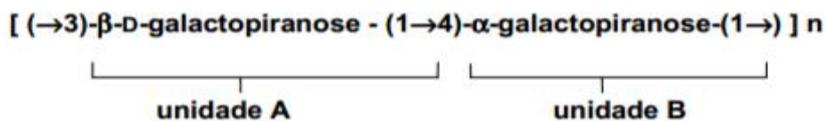


Figura 6: Estrutura representativa da galactana de algas vermelhas, formando um arranjo alternado entre as unidades A e B. Modificado de PAINTER, 1983.

Os PS majoritários de algas pardas são chamados de galactanas, compostos exclusivamente por galactose mas que 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).

Devido a grande variedade estrutural encontrada nessa espécie de alga, a cada extração e purificação de fucanas existe alta possibilidade de encontrarmos um composto estruturalmente único fazendo com que este também tenha uma atividade farmacológica única (Dietrich et al., 1995).

As alterações que podem ocorrer no padrão da ligação glicosídica nas fucanas (Ushakova, 2009), isso inclui as de *Laminaria saccharina*, *L. digitata*, *Anelipus japonicus*, *Cladosiphon okamuranus* e *Chorda filum* (Figura 7) que têm suas cadeias centrais compostas de unidades de α -(1 \rightarrow 3)-L-fucopiranoose, e também as fucanas isoladas de *Ascophyllum nodosum* e *Fucus vesiculosus*, espécies que têm suas cadeias centrais compostas de repetição α -(1 \rightarrow 3) e α -(1 \rightarrow 4)-L-fucopiranoose (Yang et al., 2011).

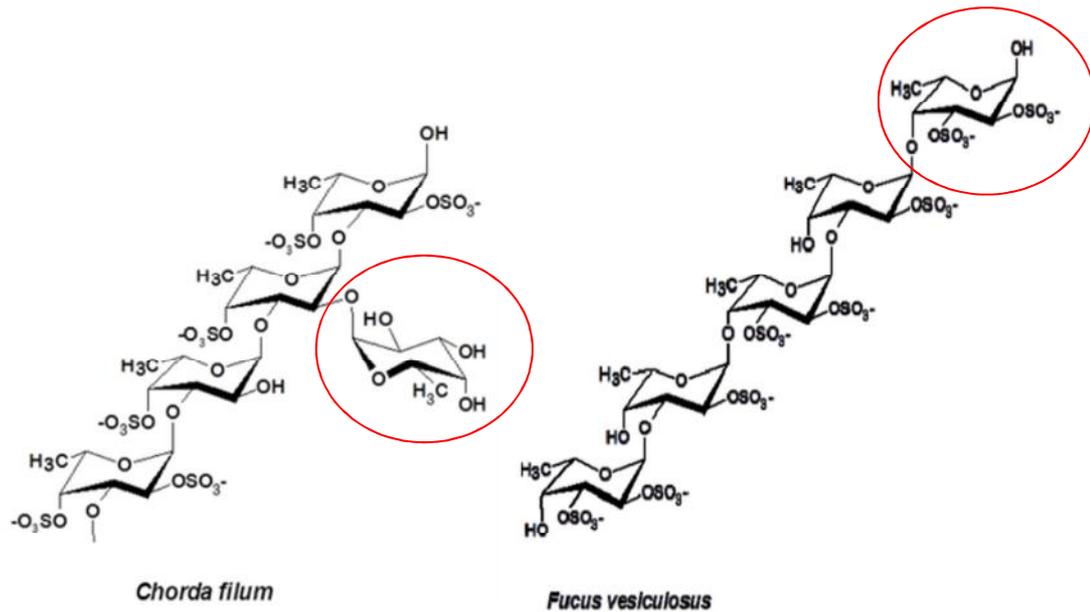


Figura 7 : Estrutura de fucoidans de *Chorda filum* e *Fucus vesiculosus*, mostrando a diferença no tipo de ligação glicosídica e na possibilidade de ramificação. Modificado de ALE et al., 2011.

As algas verdes possuem um grupo de PS bastante heterogêneos, 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). As galactanas sulfatadas, presentes nessas espécies de alga verde, tendem a possuir estruturas mais complexas e heterogêneas do que os seus homólogos em algas vermelhas. Algumas algas contêm arabinogalactanas sulfatadas e glucogalactanas sulfatadas (Love e Percival, 1964; Matsubara et al., 2001).

As algas verdes também podem ser fontes de outros tipos de PS. Isso inclui, por exemplo, um heteropolissacarídeo obtido a partir de *Enteromorpha compressa* que é solúvel em água e pode estar ligado à ramnose na posição (1 \rightarrow 2 ou 1 \rightarrow 4), a xilose e a unidades ácido glucurônico na posição (1 \rightarrow 4). Grupos sulfato, quando

presentes, podem estar situados na posição C-3 de ramnose e C-2 de xilose (Ray, 2006).

1.2 Sistema de coagulação

A coagulação sangüínea envolve uma série de reações de ativação de proteases inativas (zimogênios) por proteólise. Em cada estágio, um zimogênio é convertido em uma protease ativa pela clivagem de uma ou mais ligações peptídicas na molécula precursora. Os componentes que podem estar envolvidos em cada estágio incluem uma protease, um zimogênio, um cofator proteico não enzimático, Ca^{+2} e uma superfície organizadora, fornecida *in vitro* por uma emulsão fosfolipídica ou *in vivo* pelas plaquetas. Por convenção, os fatores de coagulação são denominados por algarismos romanos e após sua ativação por proteólise são denominados pelo seu símbolo seguido da letra “a” (Wright e col., 1962).

Em 1964, MacFarlane e Davie propuseram a hipótese do “sistema” para explicar a fisiologia da coagulação do sangue. Nesse modelo (Figura 8), a coagulação é dividida em uma via extrínseca (que usualmente não estão presentes no espaço intravascular) e uma via intrínseca (iniciada por componentes presentes no espaço intravascular). As duas vias convergem no ponto de ativação do fator X (via final comum) (MacFarlane e col., 1964; Davie e col., 1964). Por muito tempo, usou-se a divisão esquemática do sistema de coagulação em vias extrínseca e intrínseca, mas atualmente também se utiliza uma nova nomenclatura onde o sistema de coagulação é dividido em 4 fases: iniciação, propagação, amplificação e finalização. Esse modelo foi proposto baseado em superfícies celulares e o modelo antigo se baseia nos fatores de coagulação, portanto com um viés molecular (Becker, 2005). Visto que nossos ensaios biológicos são voltados para a ativação dos fatores da coagulação, nos basearemos no modelo clássico.

A via intrínseca ou via de contato é classicamente descrita como uma sequência de reações que se iniciam com a exposição do sangue a uma superfície carregada negativamente. Tal superfície seria formada por fosfolipídeos e sulfato de colesterol, que induziriam a auto-ativação do fator XII em fator XIIa. O fator XIIa ativa o fator XI, que, por sua vez, na presença de Ca^{2+} ativa o fator IXa. O fator IXa, na presença de fator VIII, ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e subsequente formação de fibrina. (Franco, 2001; Devlin, 2007; Murray et al., 2007).

Portanto, no final dessa fase há uma amplificação da ativação do fator Xa, que ativa a protrombina (fator II) em trombina, a qual converte o fibrinogênio em fibrina formando um coágulo. Para estas reações ocorrerem é necessária a formação de um complexo de fosfolípidos plaquetários aniônicos, Ca^{2+} , fator Va, fator Xa e protrombina (Figura 8) (Jay e Liu, 2006).

A via extrínseca é assim denominada, pois foi observado que o fator desencadeante que facilitava a coagulação não se encontrava no sangue circulante, sendo este fator o fator tissular (Murray et al., 2007). Quando o fator tissular é exposto após uma lesão do vaso, liga-se ao fator VII, que é dependente de cálcio, formando assim um complexo que inicia o processo de coagulação do sangue ativando o fator X. Nessa fase existem fatores exclusivos a ela, que são os fatores tecidual e VII (Franco, 2001; Devlin, 2007; Murray et al., 2007). O fator Xa e o fator Va formam um complexo que catalisa a formação de trombina por proteólise da protrombina. A quantidade de trombina formada é pequena, mas é o suficiente para catalisar a ativação dos fatores V, VII, VIII e XIII, além da formação de fibrina (Franco, 2001; Devlin, 2007; Murray et al., 2007).

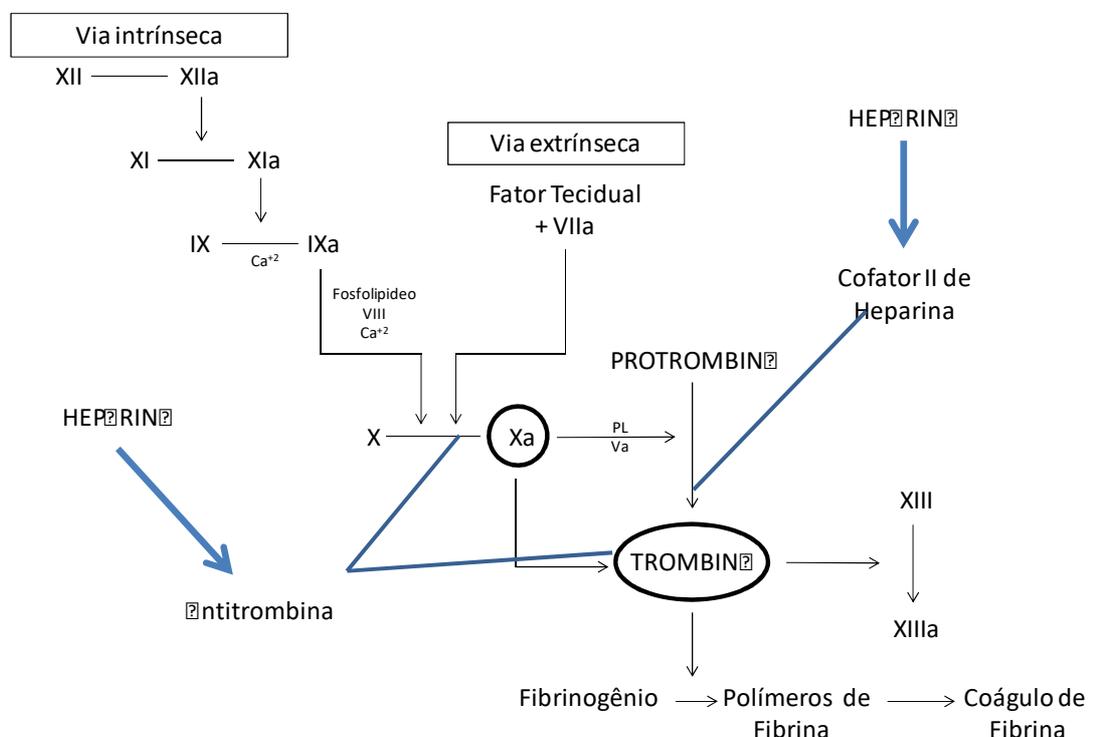


Figura 8: Diagrama do mecanismo da coagulação, indicando a ação da heparina sobre a antitrombina e cofator II da heparina. Modificado de ROCHA et al., 2006.

1.3.1 Trombose e o papel dos polissacarídeos sulfatados no sistema de coagulação

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade nos países desenvolvidos e subdesenvolvidos. Uma das principais complicações das doenças cardiovasculares é a ocorrência de trombose, tanto venosa como arterial, justificando os seus elevados índices de letalidade. Aproximadamente um milhão de pessoas morre anualmente nos Estados Unidos devido às doenças cardiovasculares. Mais de 200.000 casos de tromboembolismo ocorrem por ano nesse país (Who, 2008; Aha, 2010). No Brasil, dados do Ministério da Saúde mostram que essa doença alcança a marca de 308 mil mortes por ano, ou seja, 30% de mortes em todo país (MS, 2014).

Existem diversos fatores que alteram a homeostasia do sistema de coagulação contribuindo para o tromboembolismo, dentre eles estão a estase, danos na parede vascular, alteração de leucócitos e plaquetas circulantes. Entretanto, a coagulação sanguínea é considerada o pivô para o desenvolvimento da trombose venosa, já que estados de hipercoagulabilidade contribuem significativamente para o processo trombogênico (Herbert e col., 1992).

Outra causa de trombose é a lesão aterosclerótica. A trombose arterial é uma das manifestações agudas decorrentes da aterosclerose, principalmente no infarto agudo do miocárdio e no acidente vascular cerebral (Kurabayashi e col., 2000).

A administração de anticoagulantes reduz a ocorrência de trombose em pacientes imobilizados no pós-operatório e após traumatismo, uma vez que previne a formação e/ou o crescimento do trombo e sua embolização (Leyvraz e col., 1983; Collins e col., 1996).

Organismos marinhos são uma abundante fonte de polissacarídeos sulfatados com atividade anticoagulante e antitrombótica (Mourão e col., 1999). A procura por esses compostos não deve se limitar apenas a avaliações por ensaios comuns de coagulação, ou até um experimento in vivo de trombose. Cada tipo de polissacarídeo sulfatado demanda um estudo detalhado e extenso sobre seus efeitos no sistema hemostático, inibindo ou ativando alvos específicos na coagulação sanguínea.

1.3.2 Heparina

O principal anticoagulante utilizado na clínica é a heparina, sua estrutura é composta por um polissacarídeo linear, altamente sulfatado, 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 e a antitrombina exerce adicionalmente papel sobre o fator Xa. O sítio de ligação da heparina à antitrombina consiste em uma sequência pentassacarídica (Figura 9) (Lindahl et al., 1979).

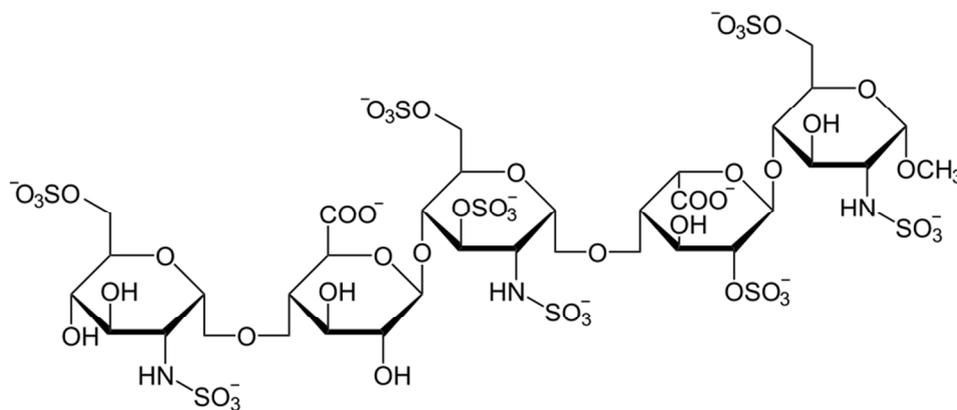


Figura 9: Sequência pentassacarídica específica de ligação da heparina a antitrombina. Retirado de Gracher, 2010.

Entretanto, o uso de heparina está associado a diversos efeitos indesejáveis, como: hemorragias, trombocitopenia, metabolismo lipídico alterado e osteoporose durante tratamentos prolongados. Grande têm sido os avanços da pesquisa para a descoberta de compostos com atividade anticoagulante para que ocorra a minimização dessas complicações.

1.3.3 Galactana sulfatada da alga *Botryocladia occidentalis*

Já existem polissacarídeos provenientes de algas descritos na literatura com atividade anticoagulante. Um exemplo é a D-galactana sulfatada (Figura 10), 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. Também foi demonstrado que a mesma galactana, porém

dessulfatada perde sua atividade. Portanto o grau de sulfatação destas moléculas é um fator importante. Porém, também foi visto que os polissacarídeos com maior densidade de sulfato apresentaram atividade anticoagulante menor que a galactana da *B.occidentalis*. Com isso pode-se concluir que a sulfatação não é o único fator para o desempenho dessa atividade. Sendo a posição em que o sulfato se encontra fundamental para obtenção da sua atividade biológica (Farias et al., 2000).

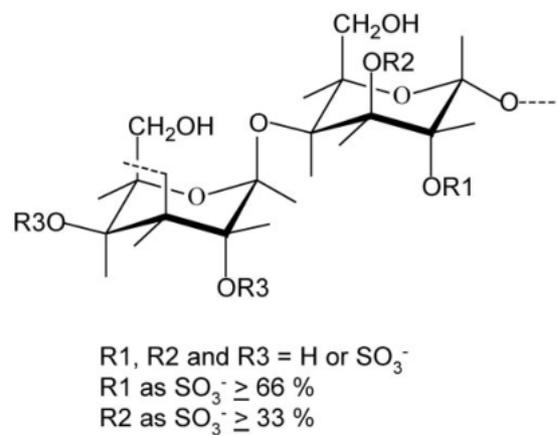


Figura 10: Estrutura da galactana sulfatada da alga vermelha *B.occidentalis*. Retirado de Melo et al., 2004.

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 à contaminação dos lotes de heparina caso estes animais estejam enfermos, em especial com patologias que poderiam afetar o Homem. Neste contexto os polissacarídeos sulfatados de origem vegetal se destacam por terem uma menor probabilidade de contaminação por xenobióticos quando comparado aos animais, além do fato das algas serem passivas de cultivo. Conjuntamente por possuir efeitos adversos 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). Cada tipo de PS demanda um estudo detalhado e extenso sobre seus efeitos no sistema homeostático, inibindo ou inativando algumas alvos específicos na coagulação sanguínea.. A alga *P.capitatus* ainda não teve seu potencial biológico, em especial sobre coagulação sanguínea, prospectado e não há relato na literatura científica sobre a presença de PS nessa espécie, além serem abundantes na Costa brasileira, da fácil coleta em bancos naturais e viabilidade de aqüicultura.

3.Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem por objetivo a avaliação da atividade anticoagulante e a caracterização parcial da estrutura dos polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha *P.capitatus*.

3.2 Objetivos específicos

- a-) Extrair e avaliar o método de extração utilizado de polissacarídeos sulfatados da macroalga *P. capitatus*,
- b-) Avaliar o tempo total de extração dos polissacarídeos sulfatados
- c-) Purificar seus polissacarídeos sulfatados,
- d-) Avaliar a sua atividade anticoagulante em ensaios *in vitro* e;
- e-) Caracterizar parcialmente a estrutura dos polissacarídeos sulfatados com atividade anticoagulante.

4. Materiais e métodos

4.1 Coleta e preparo do material

A alga *P.capitatus* (Figura 11) foi coletada pelo grupo de pesquisa coordenado pela Professora Dra. Angélica Ribeiro Soares – NUPEM/UFRJ, no litoral do estado da Bahia, na Praia de Cumuruxatiba (Figura 12). O material coletado foi transportado em recipientes plásticos contendo água do mar. No laboratório todo material foi lavado com água do mar. Após triagem, a alga foi tratada com diclorometano, visando à extração de metabólitos secundários a serem analisados fitoquimicamente, visto que essa parte está diretamente relacionada ao projeto de pesquisa da referida docente. Todo resíduo restante, foi seco em temperatura ambiente para a evaporação do solvente, triturado, acondicionados em sacos plásticos e estocados à -20°C. Em seguida, este material foi gentilmente cedido ao Laboratório Integrado de Prospecção de Produtos Bioativos – Grupo de Glicofármacos, chefiado pelo Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli.



Figura 11 : Imagem da alga verde *P. capitatus*. Retirado <http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics> em 29/11/2015.