



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
Professor Aloísio Teixeira



**ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DOS POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DA MACROALGA MARINHA *Halimeda tuna***

CAROLLINE FERREIRA DE OLIVEIRA

Macaé

Setembro de 2016

Título: ISOLAMENTO E ATIVIDADE
ANTICOAGULANTE DOS
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS
DA MACROALGA MARINHA
Halimeda tuna

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

Orientador: Leonardo Paes Cinelli

Macaé

Setembro de 2016

CAROLLINE FERREIRA DE OLIVEIRA

**ISOLAMENTO E ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DOS POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DA MACROALGA MARINHA *Halimeda tuna***

COMISSÃO EXAMINADORA

Nota Conferida: _____

Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé

Prof. Jéssica Lopes D' Deogo Gianelli

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé

Prof. Dr. Willian Jonis Andrioli

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé

Macaé

Setembro 2016

AGRADECIMENTOS

Ao meu maravilhoso e misericordioso Deus, pela vida abençoada com muita saúde e felicidades, e por todas as oportunidades que fez surgir no meu caminho. Agradeço por sempre ter me dado forças nos momentos que mais acreditei não ter saída...

Aos meus pais, Rosilene e Marcos, por investirem e acreditarem em mim, por me guiarem para os melhores caminhos, sempre com muito amor, compreensão e dedicação. Foram vocês que me ensinaram os princípios e valores que tenho como essenciais em minha vida. A pessoa que sou hoje devo a vocês! Pai, eu sei quanto foi sacrificante todos esses anos. Durante todas as idas e vindas da rodoviária a qualquer hora do dia ou da noite, eu pensava: "Nossa, só meu pai mesmo para fazer isso!". E Não só nessas horas, mas em todos os momentos que eu precisei você sempre esteve lá para me levar, buscar, amparar, ajudar e acudir com a maior boa vontade do mundo. Sua bondade me inspira a ser uma pessoa melhor a cada dia, é uma dádiva de Deus poder conviver com um ser humano tão bondoso com o próximo como você. Mãe, você é um exemplo de mulher que desejo ser. Sempre muito focada e dedicada ao alcançar seus objetivos, você é minha grande fonte de inspiração. Obrigada por não me deixar desistir, obrigada por ser meu alicerce e por ser minha melhor amiga e companheira para todas as horas. Não tem como expressar meu amor e minha gratidão por você e pelo papai. Essa vitória eu dedico a vocês!

Às minhas avós Maria e Maria da Glória por me incentivarem e acreditarem em mim sempre até quando nem eu mesma acreditava. Acredito que vocês estão vendo, intercedendo e torcendo por mim onde quer que estejam. Deixo aqui registrado toda a minha saudade, infinita gratidão e amor, essa vitória é também de vocês.

Às minhas tias Roseli e Rosemary que são minha segunda mãe, obrigada por todo carinho, amor, atenção para comigo e todas as orações durante essa longa jornada. Vocês são essenciais na minha vida!

Ao meu namorado William. Um ser humano cheio de luz que voltou para minha vida trazendo paz e enchendo-a de amor e alegria. Obrigada por todas as palavras de força e encorajamento durante minha temporada em Toledo, e principalmente, por me ajudar a concluir esse trabalho. Você foi essencial nessa fase final. Que Deus abençoe nosso relacionamento e esse seja só o começo de uma linda história que vamos construir juntos. Amo você!

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo Paes Cinelli, pela confiança, incentivo, dedicação e paciência. Por ele tenho profunda admiração e respeito. Foi um orgulho fazer parte da sua equipe.

A equipe do laboratório, que me ajudaram muito na conclusão desse trabalho. Regina, Jessica, Mayhara, Kassila, Bianca, Thamyres Moreira, Thamiris Brandão, Rayssa e Carol, vocês se tornaram uma parte da minha família de Macaé. Tenho o maior carinho por cada uma dia vocês e vou guardá-las em meu coração aonde quer eu vá.

Aos colegas de curso, pelos bons momentos que passamos juntos, pelas risadas e momentos de descontração dentro e fora da Universidade. Em especial minhas amigas, Carol e Livia, por terem sido minhas companheiras desde o início dessa longa jornada. E, claro, a minha amiga Juliana, pela parceria em todas as nossas aventuras de “quando e onde”. Obrigada pelo companheirismo nos momentos bons e ruins e pelas noites inesquecíveis.

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

(Cora Coralina)

RESUMO

As algas marinhas são fontes naturais de macromoléculas conhecidas como polissacarídeos sulfatados. Essas macromoléculas são amplamente distribuídas na natureza. 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. O grau e posição de sulfatação, glicosilação e composição monossacarídica destes polímeros variam, podendo apresentar alta heterogeneidade e, normalmente, possuem alta flexibilidade molecular. Por estas razões detém a capacidade de interagir com outros compostos. E, assim, cada polissacarídeo pode possuir conformação estrutural única e, portanto, apresentar atividade anticoagulante mais potentes do que outros compostos já descritos. O objetivo deste projeto é a purificação e análise da estrutura química e do potencial anticoagulante de polissacarídeos sulfatados oriundos da alga marinha *Halimeda tuna* coletada no litoral do Estado da Bahia. Sendo assim, a alga foi submetida a uma deslipidificação em acetona por 24 horas e posteriormente ela foi suspensa em tampão de digestão com 10% do seu peso em papaína, caracterizando assim o processo de extração dos PS e, em seguida, foi adicionado 3 volumes de etanol ao sobrenadante da extração. Logo após, os PS foram caracterizados por eletroforese em gel de agarose e quantificados por métodos químicos. Os resultados obtidos em eletroforese mostraram que a banda apresenta padrão de migração mais lento que a heparina, sugerindo que esta molécula possua alta densidade de carga negativa. A partir desse dado, a fração analisada foi submetida à cromatografia de troca-iônica (DEAE-celulose), com o objetivo de purificar seus PS, eluindo na faixa de 0,7 M a 1,5 M de NaCl. Após o processo de purificação, realizou-se outra eletroforese no qual foi observado que a fração não alterou seu padrão de migração apresentando padrão de migração semelhante à heparina. A fim de analisar a atividade anticoagulante da fração purificada, foi realizado o ensaio de coagulação TTPA onde o resultado demonstrou atividade anticoagulante, uma vez que a fração atingiu o tempo máximo de 300 segundos na quantidade mínima de 30 µg. E por fim, o ensaio estrutural no espectro de infravermelho realizado apresentando similaridade ao da heparina, confirmando a presença de bandas características de PS. Deste modo, a descoberta de um novo polissacarídeo sulfatado com potente atividade farmacológica vem sempre acompanhada de perspectivas de um novo fármaco a ser utilizado pela indústria farmacêutica.

Palavras chaves: ação anticoagulante, alga marinha, *Halimeda tuna*, polissacarídeos sulfatados.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alga <i>Caulerpa verticilata</i> .	14
Figura 2: Alga <i>Dictyota ciliolata</i> .	14
Figura 3: Alga <i>Ochtodes secundiramea</i> .	15
Figura 4: Componentes da parede celular característico de cada alga marinha.	15
Figura 5: Alga <i>Halimeda tuna</i> .	16
Figura 6: Distribuição da espécie <i>Halimeda tuna</i> no mundo.	17
Figura 7: Fórmula estrutural dos monossacarídeos frutose, glicose e galactose.	18
Figura 8: Fórmula estrutural da sacarose.	18
Figura 9: Fórmula estrutural do amido.	18
Figura 10: Estrutura molecular do açúcar da macroalga parda <i>Fucus sp</i> formada por unidades dissacarídicas de α -L-fucopirranose.	20
Figura 11: Estrutura molecular de uma agarana do tipo porfirana extraída da alga vermelha do gênero <i>Polysiphonia</i> .	21
Figura 12: Estrutura química da galactana sulfatada encontrada, majoritariamente, na alga verde <i>Codium isthmocladum</i> .	21
Figura 13: Sistema de coagulação.	22
Figura 14: Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares.	24
Figura 15: Atuação da heparina no sistema de coagulação sanguínea.	25
Figura 16: Eletroforese em gel de agarose da fração Poli-total HTU.	34
Figura 17: Cromatograma da fração Poli-total HTU extraídos da alga marinha <i>Halimeda tuna</i> em cromatografia de troca-iônica (DEAE – celulose).	35

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose da fração obtida através da cromatografia de troca iônica da fração Poli-total HTU da alga marinha <i>Halimeda tuna</i> .	36
Figura 19: Atividade anticoagulante dos PS precipitados por TTPA.	37
Figura 20: Atividade anticoagulante dos PS precipitados por TP.	38
Figura 21: Análise de infravermelho dos polissacarídeos sulfatados da fração HTU purificada extraídos da alga <i>H. tuna</i> .	40

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Fases da coagulação.	23
Tabela 1: Dosagem dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha <i>Halimeda tuna</i> da fração extraída por precipitação em única concentração de etanol.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cetavlon - brometo de cetil trimetil amônio

CS – Sulfato de condroitina

DEAE – Dietilaminoetil celulose

DMB - 1,9 azul de dimetil metileno

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EP – Embolia pulmonar

Hep - Heparina

PL – Pico da lavagem

P1 – Pico da fração HTU purificada

PS – Polissacarídeo sulfatado

Poli-total HTU - Polissacarídeo total presente na alga *Halimeda tuna*

Poli-total – Polissacarídeo total

TVP – Trombose venosa profunda

TTPA - tempo de tromboplastina parcialmente ativada

TP - Tempo de Protrombina

TRIS - 2-amino-2-hidroximetil - propano- 1,3 – diol

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	Algas Marinhas	13
1.2	<i>Halimeda tuna</i>	16
1.3	Polissacarídeos	17
1.3.1	Polissacarídeos sulfatados	19
1.3.1.1	Polissacarídeos sulfatados das algas	19
1.4	Sistema de coagulação	21
1.4.1	Heparina	26
2.	JUSTIFICATIVA	27
3.	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Coleta e preparo do material	29
4.2	Extração dos polissacarídeos (PS)	29
4.3	Precipitação em etanol dos polissacarídeos (PS)	30
4.4	Dosagens bioquímicas	30
4.4.1	Dosagem de polissacarídeos sulfatados	30
4.4.2	Dosagem de ácido urônico	30
4.5	Eletroforese em gel de agarose	30
4.6	Testes de coagulação	31
4.6.1	Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA)	31
4.6.2	Tempo de protrombina (TP)	31
4.7	Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose	32
4.8	Espectroscopia de Infravermelho	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Cromatografia de troca iônica	34
5.2	Teste de coagulação	36
5.2.1	Teste de TTPA (Teste de Tromboplastina Parcialmente Ativada)	36
5.2.2	Tempo de Protrombina (TP)	38
5.3	Caracterização estrutural dos polissacarídeos	39

6.	CONCLUSÃO	41
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Algas marinhas

O ambiente marinho apresenta uma diversidade de espécies comparável àquela presente nas florestas tropicais. Esta riqueza de espécies (biológica) é capaz de produzir uma enorme variedade de estruturas químicas com grande potencial para a descoberta de novos fármacos (Molinski, 2009).

As algas marinhas constituem um diversificado grupo de organismos autotróficos que podem ser encontrados em ambientes aquáticos e terrestres úmidos (Sze, 1997). Apresentam grande variação de forma e possuem, assim como as plantas, parede celular composta de celulose. Elas produzem oxigênio e carboidratos, como resultado da fotossíntese, que são utilizados por outros organismos, inclusive os animais (Sousa, 2010).

Nos últimos anos o interesse no estudo de algas marinhas como fonte de compostos bioativos tem crescido significativamente. Tal tendência pode ser explicada com base nos seus componentes químicos que apresentam diferentes propriedades benéficas para a saúde humana (Shin *et al.*, 2006). Além de apresentarem diversas utilidades no dia-a-dia, seja na alimentação, na indústria, agricultura e cosmético, também são ricas em polissacarídeos que lhes conferem atividade anticoagulante, antitumoral, antiviral, antitrombótica entre outras (Souza *et al.*, 2007).

As macroalgas marinhas são classificadas conforme a predominância pigmentar presentes no organismo, sendo assim são divididas em: clorofíceas, rodofíceas e feofícias (Boney, 1966).

As clorofíceas ou “algas verdes” caracterizam-se como o grupo mais complexo em relação à riqueza de espécies, elas se assemelham às plantas superiores por apresentarem clorofila *a* e *b*, fundamentais para a fotossíntese. Em termos de estrutura multicelular, possuem a celulose como principal constituinte da parede celular e apresenta amido como substância de reserva (Bortolucci e Moraes, 2011) (Figura 1).

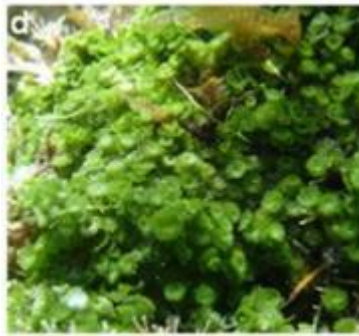


Figura 1: Alga *Caulerpa verticillata*. Adaptado do site <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/> na data 18/02/16.

Enquanto que as feofícias são chamadas de “algas pardas” por apresentarem cloroplastos castanho-dourados. Esses organismos possuem clorofilas *a*, *c* e carotenos, além do pigmento fucoxantina, responsável por mascarar a cor verde da clorofila (Bortolucci e Moraes, 2011). Sua parede celular é composta, majoritariamente, por alginatos, fucoidanas e celulose (Boney, 1966) (Figura 2).



Figura 2: Alga *Dictyota ciliolata*. Adaptado do site <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/> na data 18/02/16.

E por sua vez, as Rodofíceas, conhecidas popularmente por “algas vermelhas”, possuem clorofila *a* e *c*, em alguns casos *d* e carotenos, além dos pigmentos ficocianina e ficoeritrina, responsável pela coloração (Bortolucci e Moraes, 2011). Em sua parede celular pode-se encontrar, basicamente, ésteres, poligalactoses e celulose, podendo apresentar carbonato de cálcio também (McHugh, 2003) (Figura 3).



Figura 3: Alga *Ochtodes secundiramea*. Adaptado do site: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/> na data 18/02/16.

O que diferencia as classes das algas é, principalmente, a composição da parede celular. A celulose está presente em todas as classes, no entanto existem alguns componentes da parede celular específicos de cada alga. 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 4) (Boney,1966).

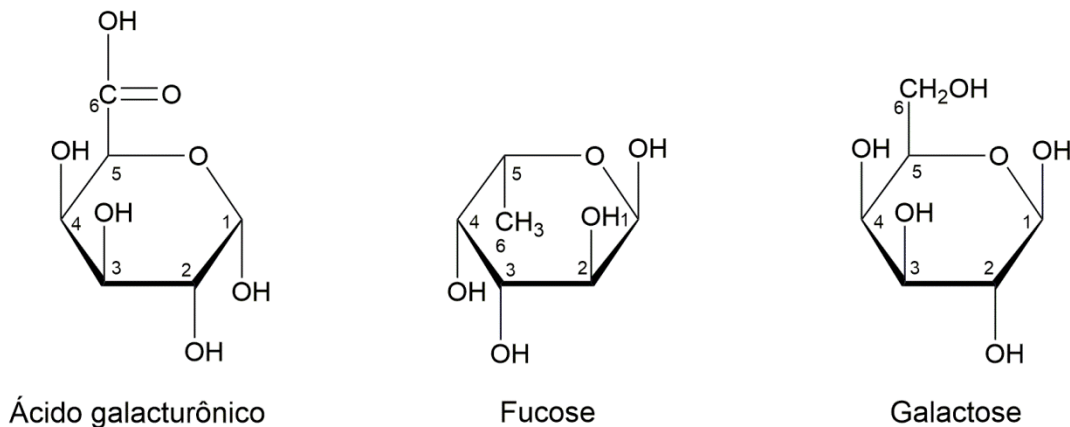


Figura 4: Componentes da parede celular característico de cada alga marinha.

Atualmente, a sistemática vegetal foi revolucionada pela aplicação de ferramentas moleculares, embora grande parte da classificação tenha sido mantida e corroborada por esta técnica. Entretanto, foi evidenciada a existência de grupamentos filogeneticamente não relacionados e que tiveram que ser realocados em grupos taxonômicos distintos (filos, ordens, famílias), ou em novos grupos criados para acomodar organismos de origens filogenéticas diferentes. Segundo Adl e colaboradores (2005), as algas são classificadas em grupos de organismos procariotos (cianobactérias) e eucariotos, que estão

divididos em três grandes grupos: Chromalveolata, Archaeplastida e Excavata, porém essa classificação encontra-se muito precoce de acordo com a literatura (Adl *et al.*, 2012).

1.2 *Halimeda tuna*

A alga verde *Halimeda tuna* (Figura 5) pertence a classe Ulvophyceae, a ordem Bryopsidales e a família Halimedaceae. Ela costuma ser citada como importante agente estruturador dos ecossistemas marinhos, assim como as outras espécies desse gênero (Hillis-Colinvauxi, 1980). Por conta do formato complexo dos seus talos, podem abrigar uma rica fauna e flora associadas, além de serem importantes produtoras de sedimentos carbonáticos (Carneiro, 2011). O crescimento é de forma ereta, pendente ou alastrando e podendo atingir até 13 cm. A reprodução assexuada ocorre pelo desenvolvimento de novo talos e a sexuada por gametas em hastes não calcificada simples ou ramificada, que se desenvolvem de nós ou na superfície de segmentos (Verbruggen, 2005).



Figura 5: Alga *Halimeda tuna*. Retirado do site: [http:// www.reefcorner.com/](http://www.reefcorner.com/) em 26/05/16.

Ela é considerada típica de ambientes tropicais, preferindo águas transparentes, quentes e em profundidades de 0 até 150 m. São abundantes

nas regiões costeiras do Nordeste, Bahamas, Caribe, Índia e ilhas do oceano Pacífico, principalmente (Figura 6) (Carneiro, 2011).



Figura 6: Distribuição da espécie *Halimeda tuna* no mundo. Retirado do site <http://www.eol.org/> em 26/05/16.

1.3 Polissacarídeos

Os carboidratos, também conhecidos como glicídios ou açúcares, são moléculas constituintes dos seres vivos, assim como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Eles atuam em processos biológicos essenciais para a vida como sinalização celular e interação entre outras moléculas, além das funções mais conhecidas como estrutural e energética (Voet, 2000).

Estruturalmente, os carboidratos podem ser divididos em classes dependendo da complexidade de sua estrutura. Os mais simples chamados de monossacarídeos podem chegar a 11 átomos de carbono, sendo que os mais conhecidos (glicose, frutose e galactose) têm seis carbonos (Figura 7) (Lehninger *et al*, 2002). Os monossacarídeos, principalmente as hexoses, podem se unir em cadeia, formando desde dissacarídeos (com duas unidades, como a sacarose, que une uma frutose e uma glicose) (Figura 8) até polissacarídeos (com mais de 20 unidades, como amido e a celulose) (Figura 9). Embora muitos polissacarídeos sejam formados pela mesma unidade, as diferenças em suas estruturas, como presença ou não de ramificações e variedade nas ligações entre as unidades, conferem a eles propriedades físico-químicas muito diversas (Voet, 2000).

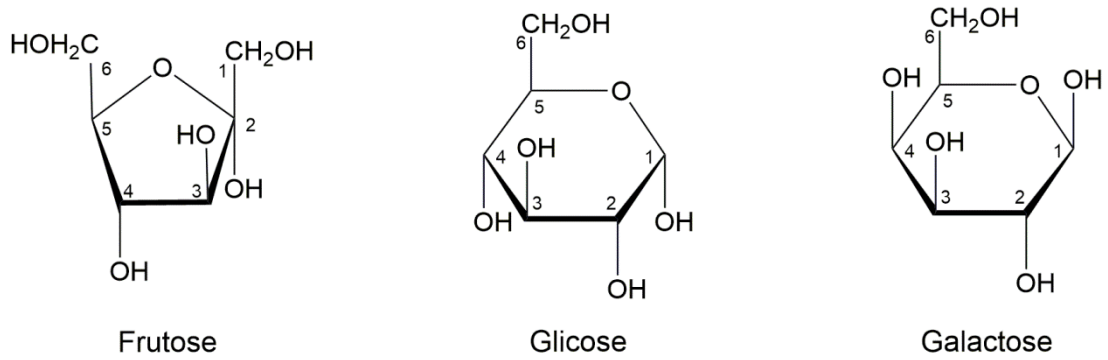


Figura 7: Fórmula estrutural dos monossacarídeos frutose, glicose e galactose.

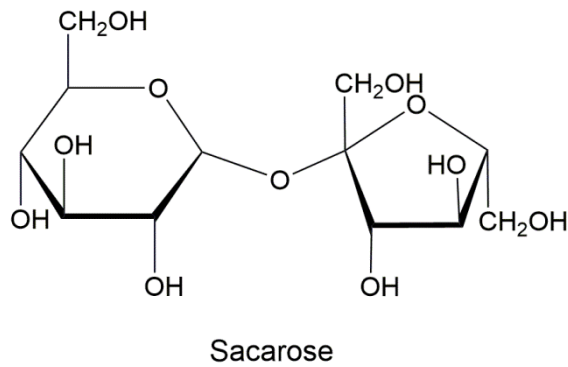


Figura 8: Fórmula estrutural da sacarose.

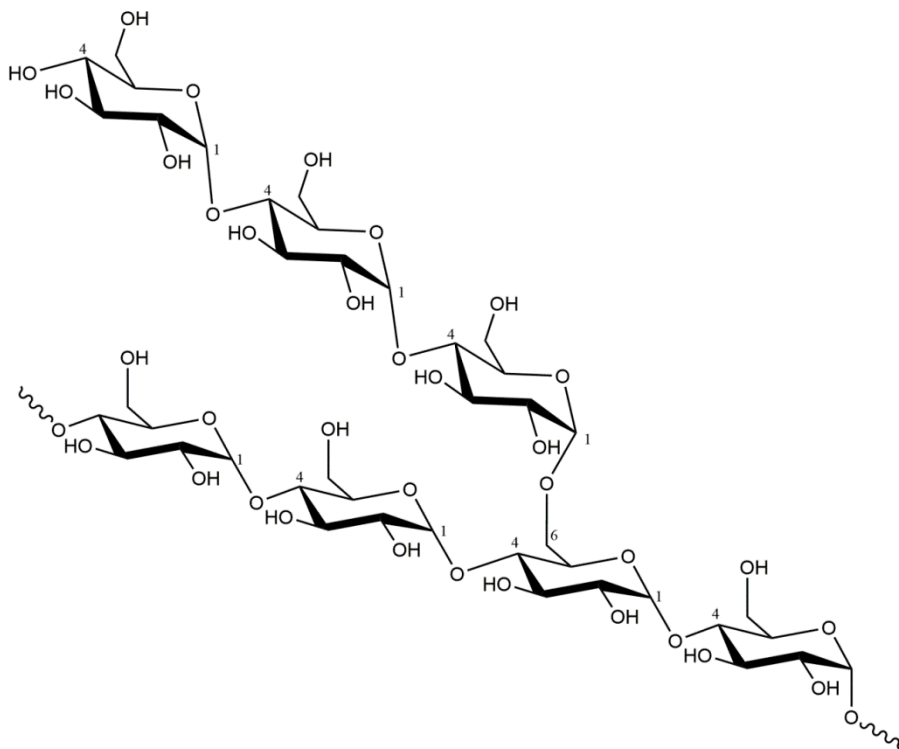


Figura 9: Fórmula estrutural do amido. Adaptado de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000300052 em 06/06/16.

1.3.1 Polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas dotadas de radical sulfato e podem ser encontradas em tecidos animais e vegetais (como algas e gramíneas marinhas) (Rodrigues *et al.*, 2009). Eles englobam um grupo complexo de carboidratos com estrutura química rica em poliânions. Por sua natureza química, apresentam inúmeras possibilidades de ligações a proteínas em solução tanto na matriz celular como no plasma sanguíneo (Arfos, 1993).

Até pouco tempo, os estudos sobre os PS se mostraram voltados para a expressão em mamíferos, algas e invertebrados marinhos. Acreditava-se que plantas superiores não apresentassem estas macromoléculas, no entanto já existem relatos da presença dessas macromoléculas em três espécies de angiospermas, são elas: *Ruppia maritima*, *Halodule wrightii* e *Halophila decipiens* (Aquino *et al.*, 2005).

1.3.1.1 Polissacarídeos sulfatados das algas

A estrutura dos PS de algas é complexa e heterogênea em relação aos polissacarídeos de angiosperma e invertebrados marinhos, que são compostos de unidades repetitivas (Mourão, 2004; Aquino *et al.*, 2005).

Percival e Mcdowell (1967) relatam que os PS podem se apresentar na forma de fucanas nas algas pardas (Phaeophyceae), de galactanas nas algas vermelhas (Rhodophyceae) e arabino-galactanas nas algas verdes (Chlorophyceae). Nos invertebrados, eles são conhecidos como glicosaminoglicanos, destacando-se o sulfato de condroitina, heparam sulfato, queratam sulfato, dermatam sulfato e heparina. (Kjellén e Lindahl, 1991).

As fucanas sulfatadas têm como característica marcante a presença de α -L-fucopirranose (Figura 10) em sua estrutura (Rocha *et al.*, 2001). Acredita-se que por possuir um caráter altamente higroscópico, as fucanas estariam relacionadas com a proteção da alga contra a desidratação, quando está submetida a longos períodos de exposição ao sol durante marés baixas. Além disso, a natureza mucilaginosa das fucanas parece tornar a alga flexível o bastante para crescer em ambiente líquido e rígida o suficiente para permanecer estendida, de forma a melhor captar a luz e os nutrientes existentes (Percival e Mac Dowell, 1967).

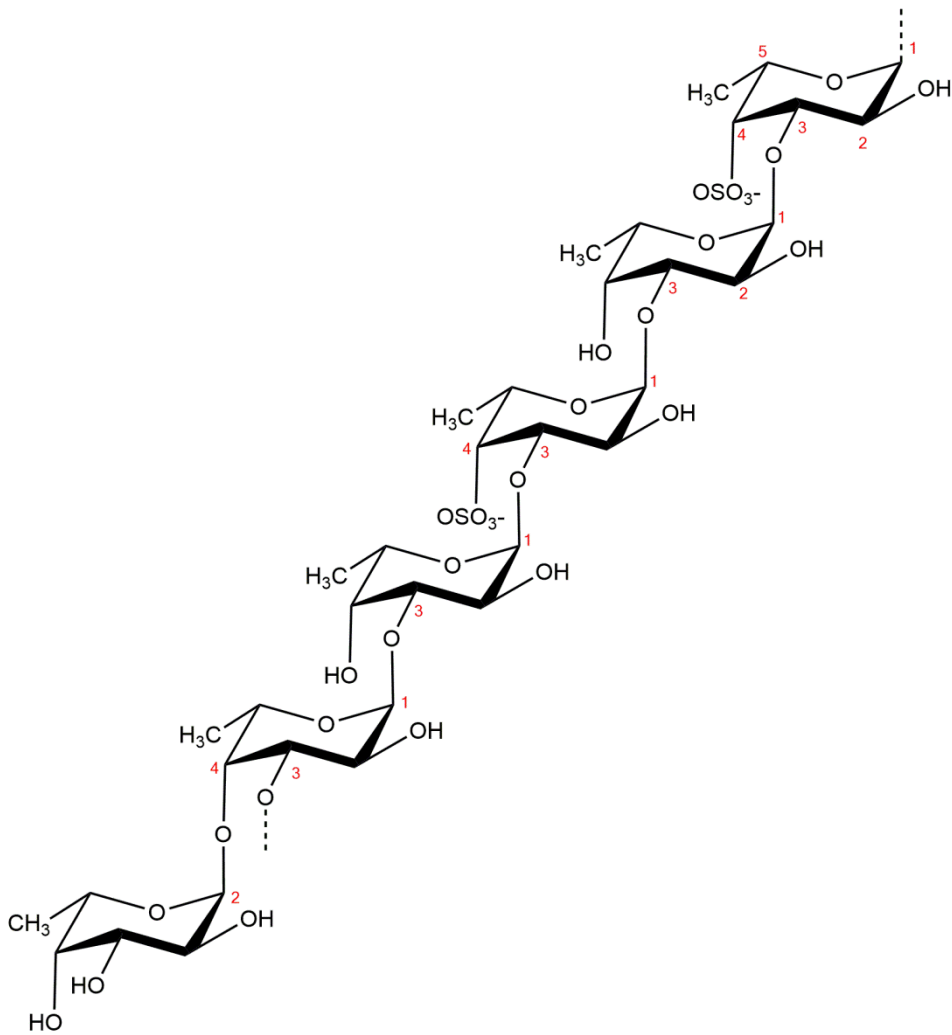


Figura 10: Estrutura molecular do açúcar da macroalga parda *Fucus sp* formada por unidades dissacarídicas de α -L-fucopirranose. Retirado de PIRES, 2013.

As galactanas, oriundas das algas vermelhas, são divididas em agaranas e carragenanas. As agaranas (Figura 11) são da série L que apresentam resíduos de α -galactose ligada no carbono 4 enquanto as carragenanas constituem a série D, sendo moléculas de elevada massa molecular composta por unidade repetitiva de dissacarídeo composta por β -D-galactopirranose ligado ao carbono 3 e/ou α -galactopirranose/3,6-anidro- α -galactopirranose ligada ao carbono 4 (Knusten *et al.*, 1994).

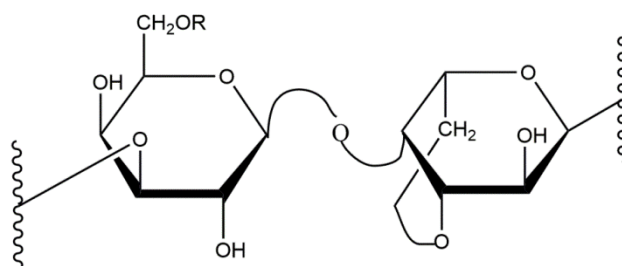


Figura 11: Estrutura molecular de uma agarana do tipo porfirana extraída da alga vermelha do gênero *Polysiphonia*. Retirado de PIRES, 2013.

Nas algas verdes, as arabino-galactanas (Figura 12) apresentam um grupo heterogêneo de polissacarídeo contendo ácido glucorônico, xilose, arabinose, manose, glucose ou galactose (Carvalho, 2000). Porém, as mais encontradas são as D-manose e galactose (Ramana *et al.*, 1991).

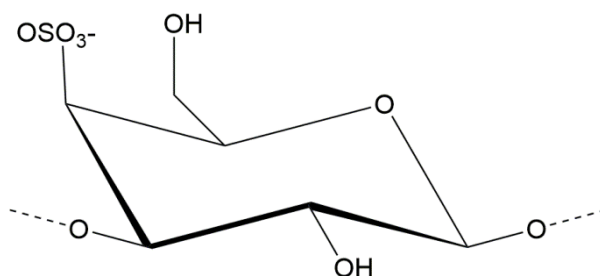


Figura 12: Estrutura química da galactana sulfatada encontrada, majoritariamente, na alga verde *Codium isthmocladum*. Adaptada de Farias *et al.*, 2006.

Várias atividades biológicas dos PS já foram descritas na literatura como: antitrombótica, anticoagulante, antiviral, antioxidante, imunomodulatória e anti-inflamatória.

1.4 Sistema de coagulação

O aumento da incidência das doenças cardiovasculares, o sedentarismo, os hábitos alimentares e o estresse são fatores que contribuem muito para desenvolvimento de disfunções relacionadas à trombose, com isso vem aumentando consideravelmente a busca por novos fármacos anticoagulantes na tentativa de encontrar um substituto para heparina (Rodrigues *et al.*, 2010)

A necessidade de explorar novas biomoléculas com propriedades biológicas oriundas de outros organismos como as algas marinhas, moluscos, equinodermos, entre outros, é justificada devido aos efeitos colaterais do uso

terapêutico da heparina, tais como plaquetopenia e hemorragia. Esse fármaco é utilizado mundialmente como agente terapêutico na prevenção de tratamento de pacientes acometidos por trombose venosa (Rodrigues e Farias, 2009).

Em 1964, Macfarlane, Davie e Ratnoff propuseram o sistema de coagulação que vigorou por muitos anos na literatura (Figura 13). Ela foi proposta para explicar a fisiologia da coagulação do sangue, segundo o qual a coagulação ocorre a partir das vias extrínseca e intrínseca (Ferreira *et al.*, 2010). A iniciação dar-se por meio de ativação proteolítica sequencial de pró-enzimas por proteases do plasma, resultando na formação de trombina, onde as duas vias se ligam tornando-se uma via comum e, então, quebra a molécula de fibrinogênio em monômeros de fibrina (Farias *et al.*, 2006).

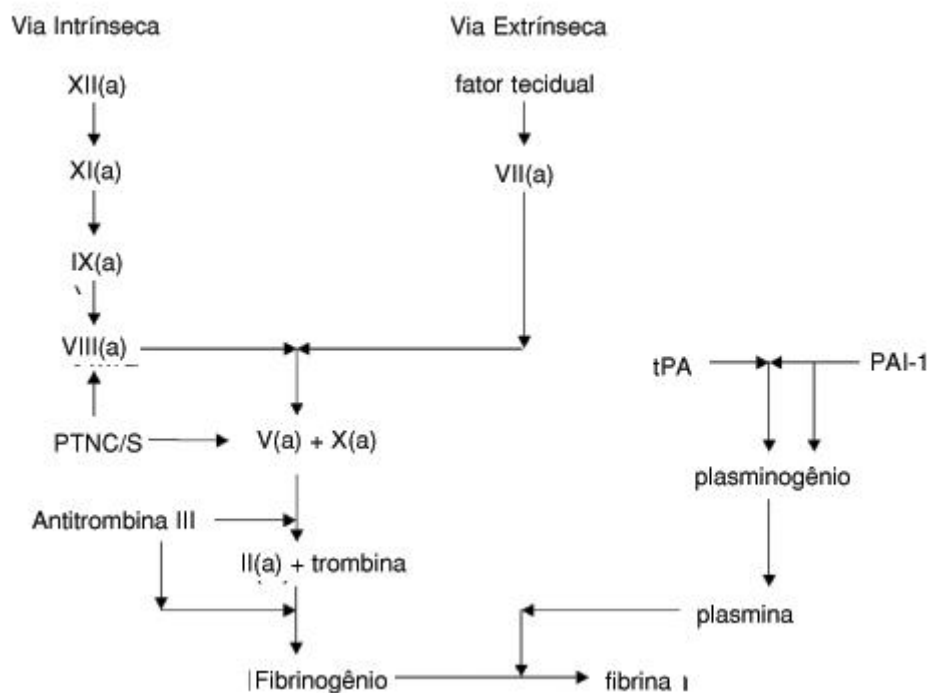


Figura 13: Sistema de coagulação. Retirado de FARIAS *et al.*, 2006.

Grandes avanços ocorreram nos últimos 15 anos no campo da homeostasia, à luz de importantes descobertas relacionadas à coagulação sanguínea *in vivo*. Embora o conceito da “cascata” da coagulação tenha representado um modelo bem sucedido e um avanço significativo no entendimento deste assunto, observações experimentais e clínicas de alguns distúrbios hemostáticos recentes demonstram que essa hipótese não reflete completamente os eventos da homeostasia (Ferreira *et al.*, 2010).

Recentemente foi proposto o modelo baseado em superfícies celulares (Figura 14). O entendimento atual do processo hemostático considera a interação dos processos físicos, celulares e bioquímicos que atuam em uma série de estágios ou fases, e não em duas vias como antes. As fases de iniciação, amplificação, propagação e finalização esclarecem tal processo (Quadro 1) (Ferreira *et al.*, 2010).

Fases da Coagulação			
Iniciação	Amplificação	Propagação	Finalização
Endotélio vascular e células sanguíneas circulantes são perturbados; Interação do FVIIa derivado do plasma com o FT.	Trombina ativa plaquetas, cofatores V e VIII, e fator XI na superfície das plaquetas.	Produção de grande quantidade de trombina, formação de um tampão estável no sítio da lesão e interrupção da perda sanguínea.	Processo da coagulação é limitado para evitar oclusão trombótica ao redor das áreas íntegras dos vasos.

Quadro 1. Fases da coagulação. Adaptado de Ferreira *et al.*, 2010.

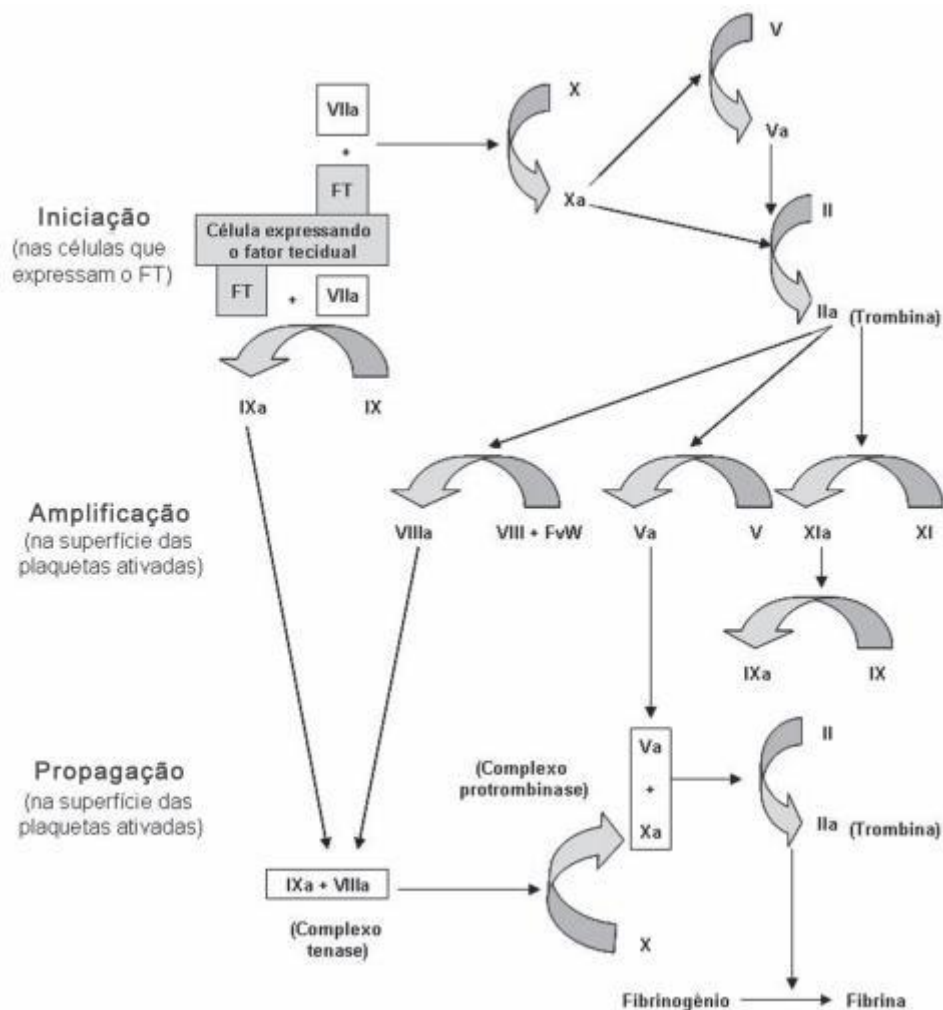


Figura 14: Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares. Retirado de Ferreira *et al.*, 2010.

1.4.1 Heparina

A utilização de polissacarídeos sulfatados surgiu a partir da necessidade de uma fonte alternativa ao uso da heparina. Esse glicosaminoglicano tem sido usado como anticoagulante e antitrombótico, sendo o segundo composto natural mais usado na medicina, perdendo apenas para a insulina. Sua utilização é frequente por causa da incidência de doenças cardiovasculares (Mourão, 2004).

A heparina é uma mistura heterogênea de polímeros de um polissacarídeo natural, extraído de tecidos animais, principalmente através da mucosa intestinal suína. Ela tem a vantagem de ser bastante específico, não produzir anafilaxia ou alergia, tendo como efeito colateral mais importante a trombocitopenia, raramente fatal (Melo, 2008).

A interação com a antitrombina é que confere o seu principal efeito anticoagulante. Ela atua na fase final da cascata de coagulação e aumentando a afinidade da antitrombina e o co-fator II da heparina por fatores do sistema de coagulação. Logo, inibe a trombina e o fator Xa, impedindo a conversão do fibrinogênio em fibrina (Figura 15). A heparina aumenta em até 2.000 vezes a inativação da trombina. Seu antídoto, amplamente empregado em cirurgia cardiovascular, é a protamina (Ofuso e Gray, 1988).

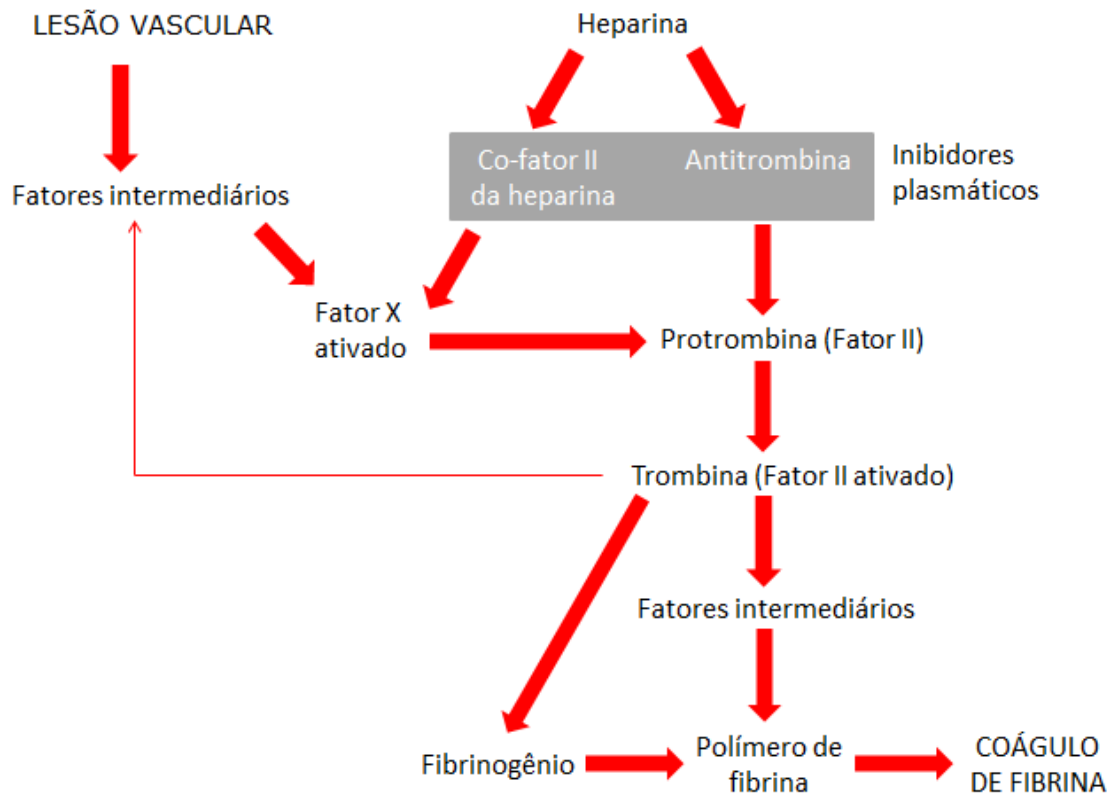


Figura 15: Atuação da heparina na cascata de coagulação sanguínea. Adaptado de <http://www.dbm.ufpb.br/~marques/Artigos/carboidratos.pdf>

A heparina pode ser utilizada em esquemas terapêuticos em baixas ou altas doses. A sua utilização, em baixas doses, está indicada quando se deseja prevenir a trombose venosa profunda (TVP) em pacientes com determinado risco trombótico (pós-operatório de cirurgias abdominais e ortopédicas, portadores de neoplasias ou sepse, pacientes em repouso prolongado, entre outros). As altas doses são utilizadas com fins terapêuticos, quando se pretende prevenir a ocorrência de um segundo episódio tromboembólico em TVP já instalado, embolia pulmonar, trombooses ou embolias arteriais ou que estejam sendo submetidos a procedimentos, que implicam em risco trombótico,

como cateterismos arteriais ou angioplastias, hemodiálise e cirurgia cardiovascular com circulação extracorpórea. Entretanto, o uso de heparina está associado a diversos efeitos indesejáveis, como: hemorragias, trombocitopenia, metabolismo lipídico alterado e osteoporose durante tratamentos prolongados. Grande tem sido os avanços da pesquisa para a descoberta de compostos com atividade anticoagulante para que ocorra a minimização dessas complicações (Hamerschlak e Rosenfild, 1996).

2. JUSTIFICATIVA

A heparina é um polissacarídeo sulfatado extraído principalmente de intestino de porco 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 e pela sua estrutura química distinta pode atuar em outros níveis moleculares no sistema de coagulação sanguínea. A alga *H. tuna* ainda não teve seu potencial biológico prospectado e nem a estrutura dos seus polissacarídeos foi elucidada, com isso houve o interesse desse estudo, podendo a mesma vir a ser detentora de um polissacarídeo sulfatado biologicamente ativo.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

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

3.2 Objetivos específicos

- a) Extrair os polissacarídeos sulfatados da macroalga *H. tuna*;
- b) Purificar seus polissacarídeos sulfatados;
- c) Avaliar a sua atividade anticoagulante em ensaios *in vitro*; e
- d) Estudar a estrutura do polissacarídeo sulfatado com atividade anticoagulante.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e preparo do material

A alga *H. tuna* foi coletada pelo grupo de Produtos Naturais de Organismos Aquáticos (GPNOA), coordenado pela Prof. Dra. Angélica Ribeiro Soares do Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio Ambiental de Macaé (NUPEM/UFRJ - campus Macaé), na Praia de Cumuruxatiba, localizada no litoral do estado da Bahia. O material coletado foi transportado em recipientes plásticos contendo água do mar até o laboratório, onde foi identificado e depositado. Em seguida, este material passou por um processo de lavagem usando água do mar. Após triagem, a alga foi tratada com diclorometano, visando à extração de metabólitos secundários, que são o alvo de estudo do GPNOA. Todo resíduo, 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.

4.2 Extração dos polissacarídeos sulfatados (PS)

A alga *H. tuna* foi seca à temperatura ambiente, triturada e submetida à despigmentação e deslipidificação em acetona por 24 horas. Mesmo com a utilização de diclorometano este procedimento padrão foi realizado a fim de minimizar contaminações futuras. Posteriormente, a mistura foi decantada, o excesso de acetona foi removido e o material foi seco novamente (60 °C por 24 horas).

Posteriormente, a alga seca foi pesada e suspensa em tampão de digestão (acetato de sódio 0,1 M, EDTA 5 mM, cisteína 5 mM em pH 5,0) com 10% do seu peso seco em papaína. 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 desse corante na presença de PS, que passa da cor azul para a cor rosa na presença dessa classe de compostos. No término de cada extração, retirou-se uma alíquota de 50 µL do sobrenadante oriundo da extração e adicionou-se 1 mL de DMB. Quando não mais se observou a alteração da cor a extração foi encerrada (Farias *et al.*, 2000).

4.3 Precipitação em etanol dos PS

Os sobrenadantes de cada extração obtidos através da completa digestão proteolítica foram reservados unidos e submetidos a adição de três volumes de etanol P.A. (Poli-total HTU) para que ocorresse a precipitação dos PS. O processo de precipitação ocorreu à $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, o material foi submetido à centrifugação à 2500 rpm por 20 min à temperatura ambiente e dialisados exaustivamente contra água destilada, liofilizados e armazenados a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Landeira-Fernandez *et al.*, 2000).

4.4 Dosagens químicas

4.4.1 Dosagem de polissacarídeos sulfatados

Para a quantificação dos polissacarídeos sulfatados foi construída previamente, uma curva padrão com condroitim sulfato (sulfato de condroitina de baleia) (1 mg/mL) e adicionados 1mL de corante DMB a 0,1% as quais foram monitoradas utilizando espectrofotômetro ($A_{525\text{nm}}$). Este corante possui coloração azul e na presença de PS sua coloração se altera do azul para um tom lilás/róseo. Os valores de absorbância foram anotados e somente curvas com $R > 0,99$ foram aceitas (Rodrigues *et al.*, 2009b).

4.4.2 Dosagem de ácido urônico

Para quantificação de ácido urônico foi utilizado uma curva padrão construída com glucuronolactona (0,1 mg/mL). Para tal, as amostras foram incubadas por 12 minutos à $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ com H_2SO_4 concentrado e borato, sendo resfriadas em seguida. Posteriormente foram adicionados 40 μL de carbazol (0,2%) às amostras que ficaram incubadas por 10 minutos à $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ e novamente resfriadas. Essas soluções foram monitoradas utilizando espectrofotômetro ($A_{525\text{nm}}$). Os valores de absorbância foram anotados e somente curvas com $R > 0,99$ foram aceitas (Dische, 1947).

4.4.3 Dosagem de hexose

Para a quantificação das hexoses totais foi utilizado uma curva padrão construída com glicose (1mg/mL). Foram adicionados às amostras 20 μL de fenol a 80% seguido de 1mL de H_2SO_4 concentrado. As soluções foram

resfriadas por 30 minutos à temperatura ambiente e monitoradas utilizando-se espectrofotômetro (ABS 490nm). Os valores de absorbância foram anotados e somente curvas com $R > 0,99$ foram aceitas (Dubois et al., 1956).

4.5 Eletroforese em gel de agarose

As frações de PS foram analisadas por eletroforese em gel de agarose, como descrito por Dietrich & Dietrich (1976). Alíquotas de até 10 μL de cada fração contendo aproximadamente de 10 a 12 μg foram submetidas à eletroforese. Como padrão de mobilidade eletroforética foram aplicados/utilizados 6 μg de sulfato de condroitina e 4 μg de heparina bovina. Adicionalmente, nos poços foram aplicados 3 μL de solução saturada de cresol, substância utilizada para visualização da corrida. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,5 %, preparado em tampão 1,3 diaminopropano acetato 0,05 M (pH 9,0). O gel foi submetido a 110 V por 1 h. Os PS no gel foram fixados por 12 h com solução de Cetavlon 0,1 % em água destilada. Em seguida, o gel foi desidratado e corado com azul de toluidina 0,1 % que se complexa com compostos sulfatados e passa a apresentar coloração violácea e em seguida, descorado por $\text{H}_3\text{CCOOH}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (0,1:5:5, v/v) (Dietrich e Dietrich, 1976).

4.6 Testes de coagulação

4.6.1 Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA)

Neste ensaio, amostras de plasma normal citratado (100 μL) foram adicionados a diferentes concentrações de PS e foram incubadas com 100 μL de reagente de TTPA (cefalina). Após 2 min de incubação a 37 °C, 100 μL de CaCl_2 (25 mM) foi adicionado a mistura e o tempo de coagulação foi monitorado em um coagulômetro (Amelung KC4A). Os resultados foram expressos em quantidade de polissacarídeo necessária para prolongar o tempo de coagulação (TTPA) em 300 segundos (Glauser *et al.*, 2009).

4.6.2 Tempo de protrombina (TP)

O ensaio de coagulação PT foi feito pelo método de Quick. 100 μL de plasma e 10 μL das amostras (0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em salina fisiológica) foram

misturados e aquecidos à 37 °C por 1 minuto. Passados o tempo de incubação, a mistura foi adicionada 100 µL de tromboplastina de cérebro de coelho e o tempo de coagulação gravado. Os resultados foram expressos como quantidade de polissacarídeo necessária para prolongar o tempo de protrombina (TP) (Assafim *et al.*, 2006).

4.7 Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose.

Os polissacarídeos extraídos das frações precipitadas foram submetidos à cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada e lavada com tampão de equilíbrio (Tris 20 mM, EDTA 50 mM em pH 7,4). Os PS foram eluídos em gradiente linear de NaCl e solubilizados no tampão de equilíbrio. O fluxo da coluna foi de 0,50 mL/min e frações de 1,0 mL foram recolhidas e monitoradas (A_{525}) por meio da propriedade metacromática na presença de DMB. As frações de PS obtidas foram dialisadas exaustivamente contra a água destilada, concentradas por liofilização e armazenadas a – 20 °C até a realização dos ensaios posteriores (Farndale *et al.*, 1986).

4.8 Espectroscopia de Infravermelho

Aproximadamente 0,1 mg das amostras liofilizadas foram adicionadas a 1 mg de brometo de potássio e maceradas até a obtenção de uma mistura homogênea. A seguir foram preparadas pastilhas em prensa hidráulica, aplicando-se uma força de 15 toneladas por 5 minutos, as quais foram submetidas à análise por infravermelho. Os espectros de infravermelho foram registrados com um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Spectrum 65 FT-IR, entre 400 e 4000 cm^{-1} . As medições foram realizadas com resolução de varredura 4 cm^{-1} , em condições ambientais normais (Adaptado de Wu *et al.*, 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e precipitação dos PS

Os polissacarídeos sulfatados extraídos por digestão proteolítica foram precipitados em uma única concentração de etanol, e em seguida, liofilizados e pesados, podendo assim calcular o rendimento da extração (Tabela 1).

5.2 Dosagem dos PS e Ácido urônico

Os PS foram dosados através de uma curva utilizando condroitim sulfato como padrão (Tabela 1), e posteriormente submetidos à eletroforese em gel de agarose (Figura 16). De acordo com a dosagem pode-se observar que o Poli-total HTU representou 10% de rendimento. Trabalhos envolvendo a extração de PS de algas marinhas demonstraram que o rendimento pode sofrer variação segundo a metodologia e a espécie utilizada. Amorim (2005) obteve na realização de três extrações aquosas consecutivas seguida por precipitação em única concentração de etanol absoluto, rendimentos de frações solúveis de PS totais da alga marinha vermelha *Halymenia floresia* de 4; 20,6 e 14%, respectivamente. Com isso, confrontando o resultado obtido mostra-se razoável comparado aos dados da literatura. O emprego de diferentes metodologias de extração, o uso de diferentes agentes precipitantes, a variação sazonal e a utilização de diferentes podem influenciar o rendimento final de PS (Rodrigues, 2009a).

Através da dosagem de PS obteve-se o resultado de aproximadamente 10%, o que corresponde a 395 mg de polissacarídeo sulfatado com relação ao peso inicial da alga. Já a dosagem de hexose resultou em 6,7%, correspondendo a 268 mg também em relação ao peso inicial da alga.

Através da eletroforese em gel de agarose observou-se que o Poli-total HTU tem um padrão de migração similar a heparina e apresenta uma banda polidispersa, podendo indicar polissacarídeos diferentes sendo extraídos na mesma fração.

Tabela 1: Dosagem dos polissacarídeos sulfatados e de ácido urônico da alga marinha *Halimeda tuna* das frações extraídas por precipitação única de etanol.

Frações precipitadas com etanol	Peso inicial da alga	Rendimento	Polissacarídeo sulfatado (mg)	Ácido urônico
Poli-total	4000 mg	400 mg (10%)	395 mg (~10%)	268 mg (6,7%)

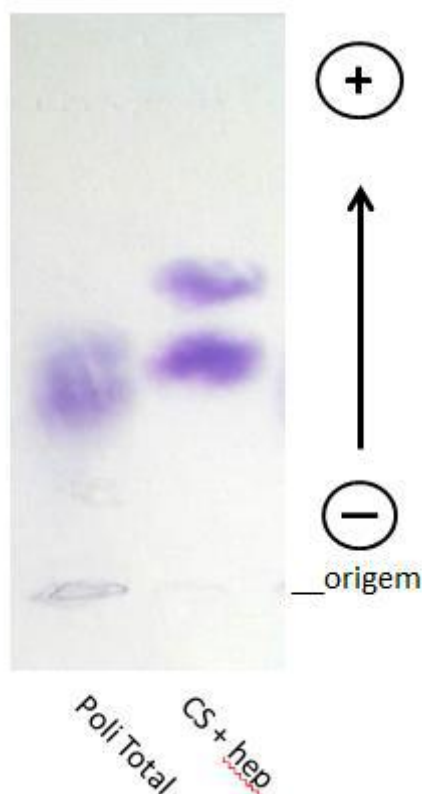


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose das frações Polissacarídeo Sulfatado (PS) e Ácido Urônico.

5.3 Cromatografia de Troca iônica

O emprego de procedimentos cromatográficos, utilizando a matriz trocadora aniônica DEAE-celulose, tem sido eficiente na separação de frações de PS em várias espécies de algas marinhas. Isso se dá pelo fato desta matriz ser carregada positivamente, enquanto que os PS são carregados negativamente. Logo, ocorre interação entre a matriz e essas moléculas, pois apresentam cargas contrárias, as quais são posteriormente eluídas com tampão contendo concentrações crescentes de NaCl. Este, por sua vez, promove a ruptura dessa interação, separando então os PS com diferentes

padrões de sulfatação na molécula (Bezerra-neto *et al.*, 2008). A eficiência de separação se traduz em vantagens, tendo em vista o elevado grau de complexidade e heterogeneidade dos compostos presentes nas diferentes espécies de algas, dificultando a sua caracterização estrutural posterior, quando não é realizada essa abordagem metodológica de cromatografia (Zhang *et al.*, 2003).

De acordo com a cromatografia pode-se observar que o material eluiu na faixa de 0,9 M a 1,5 M em um único pico metacromático (P1) (Figura 17). Além disso, a presença de um polissacarídeo neutro (PL) pode ser observada através da dosagem de hexose, onde é possível observar um pico majoritário sem gradiente molar de NaCl (tampão de equilíbrio) quando comparado ao segundo pico que coincide com o pico metacromático. Assim, como foi observada, a coluna de troca iônica DEAE-celulose foi eficiente na confirmação da purificação da fração de PS da *H. tuna*. Este resultado mostra que o processo de cromatografia foi capaz de separar dois tipos de PS na fração, neutro e sulfatado. Também foi realizada uma eletroforese em gel de agarose da fração obtida a partir dessa cromatografia, no qual apresentou a característica de co-migração com a heparina ou abaixo dela (Figura 18).

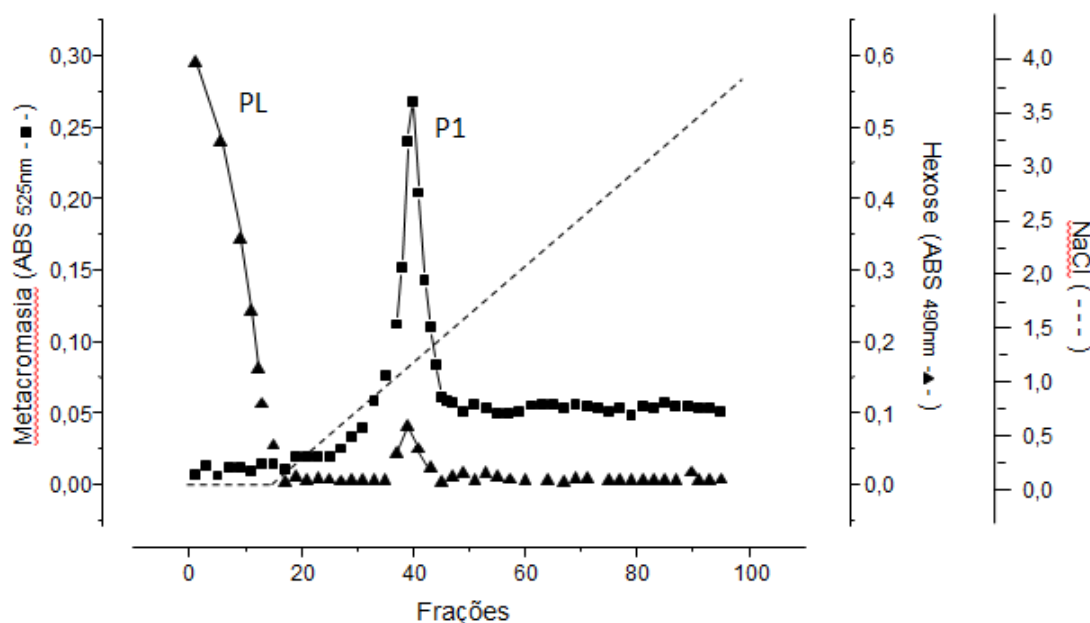


Figura 17: Cromatograma da fração HTU purificada (P1) em cromatografia de troca iônica (DEAE – celulose).

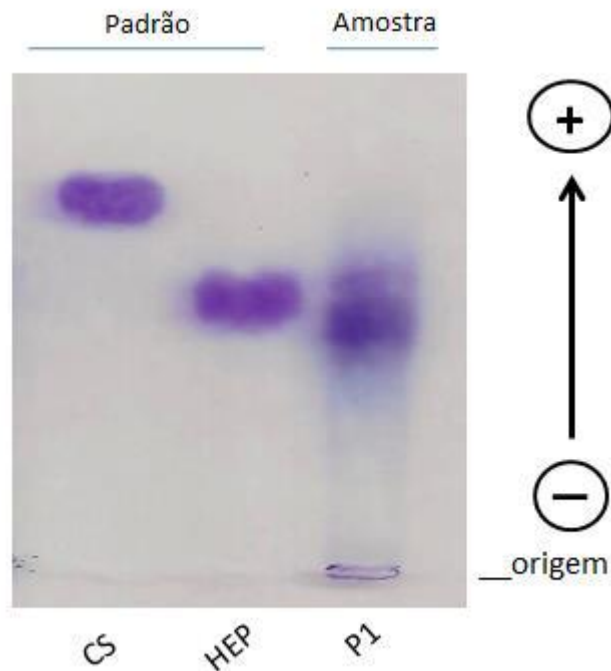


Figura 18: Eletroforese em gel de agarose da fração obtida através da cromatografia de troca iônica da fração HTU purificada (P1).

5.4 Teste de coagulação

5.4.1 Teste de TTPA (Teste de Tromboplastina Parcialmente Ativada)

O teste do TTPA é um dos mais usados na medição de polissacarídeo sulfatado com atividade anticoagulante, indicando com precisão o potencial anticoagulante do composto isolado (Mourão e Pereira, 1999). Este teste é considerado mais demorado, pois deve ocorrer ativação da fase-contato para posterior desencadeamento da via intrínseca da coagulação. E ele contém um ativador plasmático e fosfolipídios que atuam como substituinte das plaquetas. Nele, a mistura reacional deve ser recalcificada e a formação do coágulo é cronometrada. Assim a espécie apresentou atividade coagulante na fração, uma vez que o teste revelou que a fração HTU purificada atingiu o tempo máximo de 300 segundos na quantidade mínima de 30 µg, comparando com o padrão de heparina não-fracionada (Figura 19).

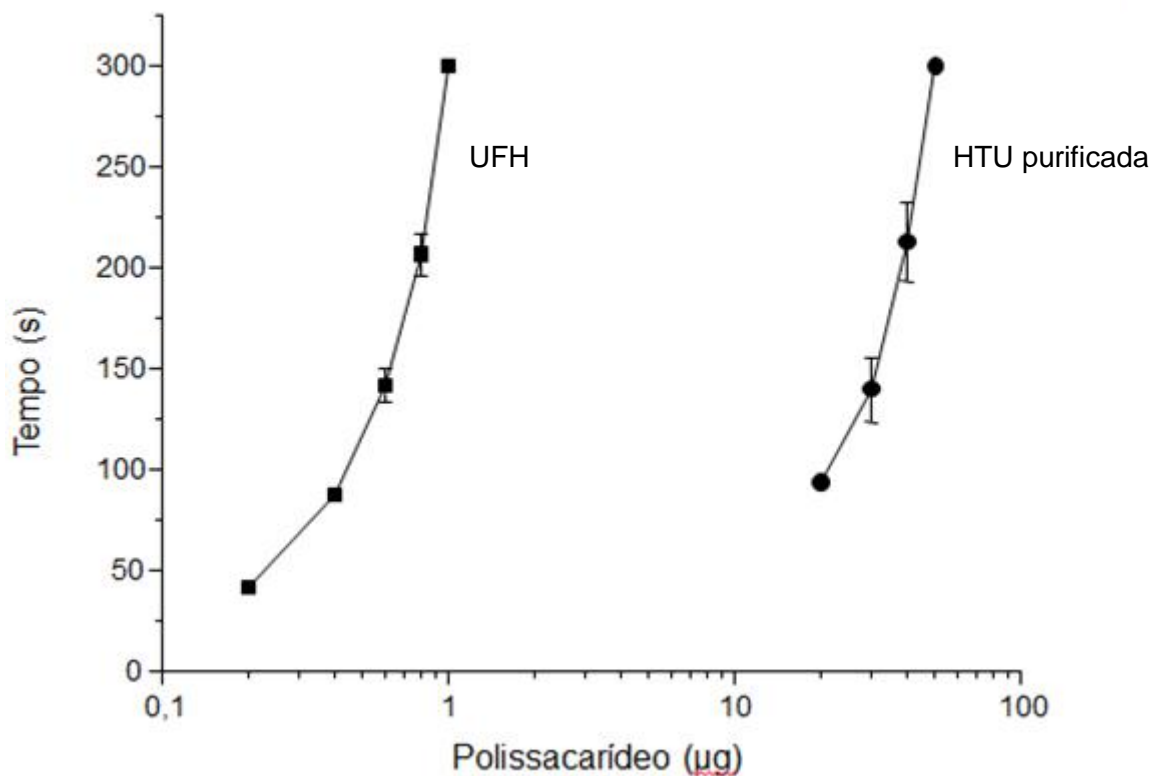


Figura 19: Atividade anticoagulante da fração HTU purificada precipitados por TTPA.

Vários PS extraídos de algas marinhas reportaram acentuada atividade anticoagulante. Como é o caso da D-galactana extraída da alga marinha vermelha *B. occidentalis*, onde o PS inibiu a ação da trombina via antitrombina e cofator II da heparina e de fucanas sulfatadas das algas marinhas pardas *Laminaria digitata*, *Pelvetia canaliculata*, *Fucus vesiculosos*, *Sargassum muticum* e *Ascophyllum nodosum* que também apresentaram atividade anticoagulante exercendo um efeito inibitório direto na trombina independente da antitrombina (Rodrigues e Farias, 2008). Neste estudo, os PS obtidos da alga *H. tuna* prolongaram significativamente o tempo de coagulação do plasma humano.

5.4.2 Tempo de Protrombina (TP)

O tempo de protrombina (PT) foi descrito por Quick, em 1935, para quantificar a protrombina e avaliar os fatores II, V, VII e X da coagulação (via extrínseca). Esse teste contém como ativador plasmático a tromboplastina (Quick A.J, 1935).

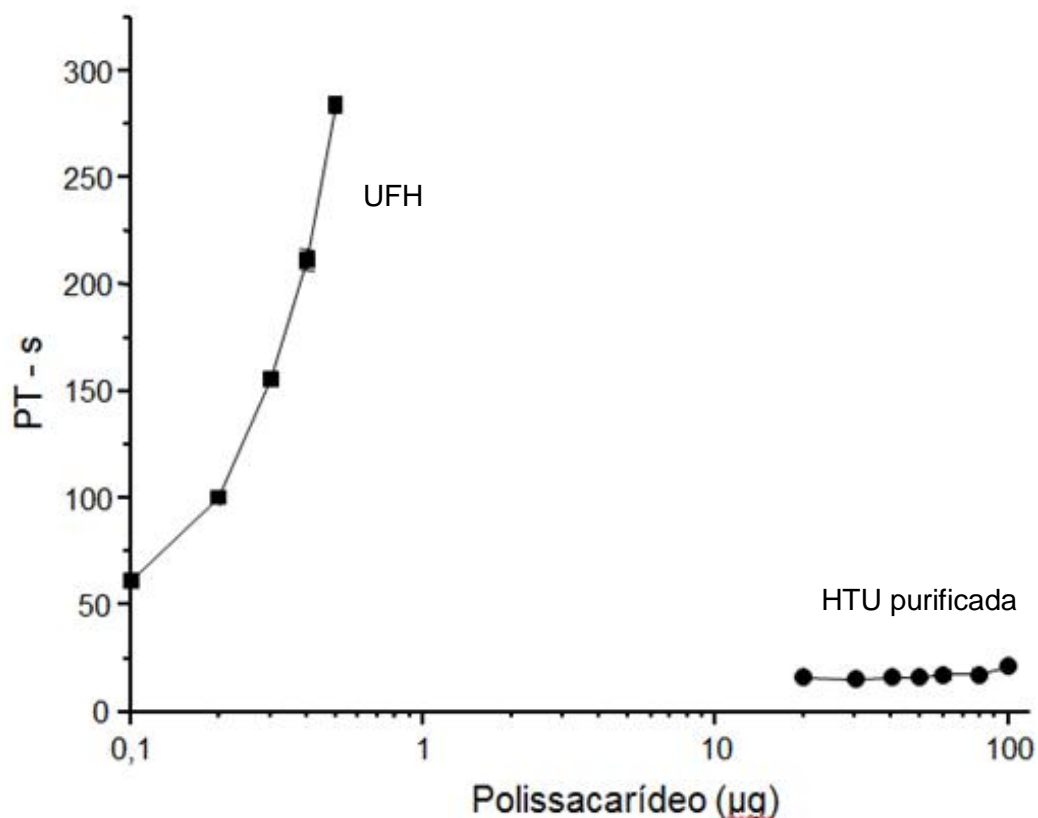


Figura 20: Atividade anticoagulante da fração HTU purificada precipitados por TP.

Através do teste pode-se observar que a fração não obteve atividade significativa, não atingindo o tempo máximo mensurado nesse ensaio. Com isso, é possível afirmar que a fração Poli HTU purificada não possui atividade coagulante na via extrínseca do sistema de coagulação.

A ausência de atividade anticoagulante da fração HTU purificada pela via extrínseca da *H. tuna* é normal, uma vez que a maioria das algas apresenta esse comportamento. Somente poucas algas apresentam atividade anticoagulante pelas duas vias.

5.5 Caracterização estrutural do polissacarídeo sulfatado de *H. tuna*.

Polissacarídeos são macromoléculas de difícil elucidação estrutural devido sua complexidade química, resultante da diversidade de ligações e grupos substituintes (Berteau, 2003). O espectro no infravermelho tem sido comparado a uma "impressão digital" de uma molécula. Portanto se duas amostras puras têm diferentes espectros no infravermelho, pode-se concluir que elas representam diferentes compostos. Eles fornecem uma grande riqueza de informações sobre as estruturas dos compostos (Silverstein *et al.*, 2006).

A fração purificada dos polissacarídeos sulfatados de *H. tuna* foi submetida à espectroscopia na região do infravermelho de modo a fornecer informações estruturais da mesma. O espectro obtido mostrou-se bastante similar ao obtido para heparina (Figura 21), cabendo mencionar os grupos funcionais característicos de carboidratos: região entre 1200 e 900 cm^{-1} , característico da ligação entre os monômeros formadores do polímero. A banda mais intensa observada entre 3700 – 3200 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação O–H, característica dos monossacarídeos. Observou-se também a presença de sinais característicos de grupamento sulfato, estiramento assimétrico da ligação S=O em torno de 1050 cm^{-1} e estiramento da ligação C=O em torno de 1700 cm^{-1} , esta última associada ao grupo ácido carboxílico do ácido urônico (Abreu, 1997, Silverstein *et al.*, 2006, Wu *et al.*, 2013). Desse modo, de posse dos dados de infravermelho é possível inferir que a fração dos polissacarídeos sulfatados de *H. tuna* tem similaridade estrutural com a heparina, salvo a intensidade do estiramento assimétrico da banda na região de 1250 cm^{-1} , que mostrou-se menos intensa. Fato que possivelmente se deve ao ambiente químico em que os grupos sulfatados dos polissacarídeos de *H. tuna* se encontram ser diferente daquele observado para a heparina. Para elucidar essa questão seria necessária uma completa caracterização espectral via técnicas adicionais, como, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.

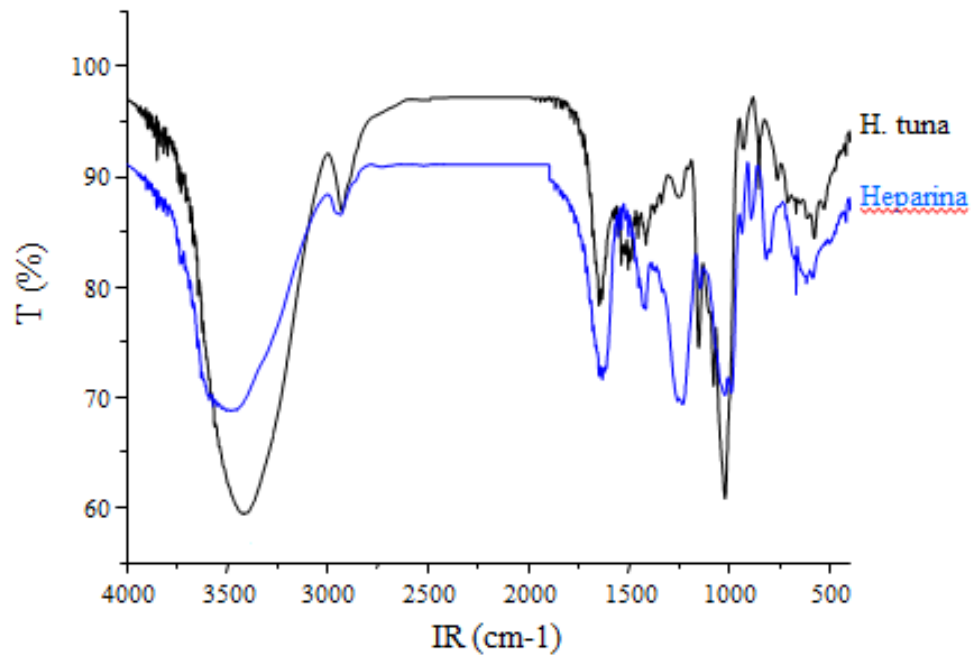


Figura 21: Análise de infravermelho dos polissacarídeos sulfatados da fração HTU purificada.

6. CONCLUSÃO

- Aproximadamente 10% da constituição da alga *H. tuna* são polissacarídeos.
- A fração de Poli-total HTU apresentou atividade anticoagulante via intrínseca, mas sem atividade pela via extrínseca.
- O processo de purificação por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) foi eficiente para a purificação de polissacarídeos.
- O espectro de IV da fração se apresentou similar ao da heparina, confirmando a presença de bandas características de polissacarídeos sulfatados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, H. S. “Estimativa por infravermelho da concentração da unidade estrutural β -O-4 em ligninas de angiospermas tropicais.” **Química nova**, v. 20, n. 6, p. 592-598, 1997.

Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., Mccourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W., Taylor, M. F. J. R. “The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists.” **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399-451, 2005.

Adl, S. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. L., Lynn, D. H., Mcmanus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Standridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. “The revised classification of eukaryotes.” **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 429-514, 2012.

AMORIM, R.C.N. Polissacarídeos sulfatados das algas marinhas vermelhas *Gracilaria ornata* Areschoug e *Halymenia floresia* (Clemente) C. Agardh: caracterização química e atividade biológica, 2005. 89f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2005.

AQUINO, R. S. et al. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: ARFORS, K. E.; LEY, K. Sulfated polysaccharides in inflammation. *J. Lab. Clin. Assafim, M., Ferreira, M. S., Frattani, F. S., Guimarães, J. A., Monteiro, R. Q., Zingali, R. B.* “Counteracting effect of glycyrrhizin on the hemostatic

abnormalities induced by *Bothrops jararaca* snake venom.” **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 6, p. 807-813, 2005.

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

Assafim, M. et al. Counteracting effect of glycyrrhizin on the hemostatic abnormalities induced by *Bothrops jararaca* snake venom.” **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 6, p. 807-813, 2006.

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.

BEZERRA-NETO, A. F. Cultivo de Algas Marinhas como Desenvolvimento de Algas Marinhas, 2008. 75P. **Tese (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente)**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

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

BORTOLUCCI, P.D. ; MORAES, C.P. Produção de material didático referente à “macroalgas” marinhas das divisões Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta. **Rev. Scientia Plena** v.7, 044401(2011).

Carneiro, P. B. M. Aspectos ecológicos de *Halimeda opuntia* (L.) J.V. Lamour. (Chlorophyta, Bryopsidales) em trecho recifal da Praia de Pirangi, Rio Grande do Norte / Pedro Bastos de Macedo-Carneiro, 2011.

CARVALHO, Luciana Retz de; ROQUE, Nidia F.. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 23, n. 6, p. 757-764, Dec. 2000

Dietrich, C. P.; Dietrich, S. M. C. "Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers." **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DISCHE Z. A specific color reaction for glucuronic acid. **J Biol Chem** 171: 725-730; 1947

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

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

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, 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.

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.

FERREIRA, C.N. , SOUSA, M.O. , DUSSE, L.M.S. , CARVALHO, M.G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2010;32(5):416-421.

Glauser, B. F., Rezende, R. M., Fabio R. Melo, F. R., Pereira, M.S., Francischetti, I. M. B., Monteiro, R. Q., Alireza R. Rezaie, A. R., Mourão, P. A. S. "Anticoagulant activity of a sulfated galactan: Serpin-independent effect and specific interaction with factor Xa." **Thrombosis and haemostasis**, v. 102, n. 6, p. 1183-1193, 2009.

Hamerschlak, N., Rosenfeld, L.G.M. Utilização da Heparina e dos Anticoagulantes Orais na prevenção e tratamento da trombose venosa profunda e da embolia pulmonar. **Arq Bras Cardiol** volume 67, (nº 3), 1996

HILLIS-COLIVAUX, L .Ecology and taxonomy of Halimeda: primary producer of coral reefs. **Avances in Marine Biology**, v. 17, 1980.

KJELLÉN, L.; LINDAHL, U. Proteoglycans: structure and interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 443- 475, 1991.

KNUTSEN, S.H.; MYSLABODSKI, D.E.; LARSEN, B.; USOV, A.I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Bot. Mar.**, v.37, p.163–170, 1994.

LANDEIRA-FERNANDEZ, A.M. ; AIELLO, K.R.M. ; AQUINO, R.S. ; SILVA, L.C.F. ; MEIS, L. ; MOURÃO, P.A.S. A sulfates polysaccharide from the sarcoplasmic reticulum of sea cucumber smooth muscle is na endogenous inhibitor of the Ca²⁺ -ATPase. **Rev. Glycobiology** 10 (8): 773-779, 2000.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.; COX, M.M. Princípios de bioquímica. São Paulo: Sarvier, 2002.

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
Rev. Med., v. 121(2), p. 201-202, 1993.

MELO, Eduardo I. et al . Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, São José do Rio Preto , v. 23, n. 2, p. 169-174, June 2008 .

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., **Rev. Glycobiology** Vol. 279, No. 20, Issue of May 14, pp. 20824–20835, 2004.

Molinski TF, Dalisay DS, Lievens SL, Saludes JP 2009. Drug development from marine natural products. **Nat Rev Drug Disc** 8: 69-85.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. Trends on Cardiovascular Medicine, **Rev. Med.**, v. 9, n. 8, p. 225-232, 1999.

OFUSO, F.A.; GRAY, E. Mechanisms of action of heparin: applications to the development of derivatives of heparin and heparinoids with antithrombotic properties. *Semin Thromb Hemost*. 1988;14(1):9-17.

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. New York: Academic Press, 1967. 219 p.

PIRES, C.L. Avaliação dos efeitos dos polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas sobre a Fosfolipase A2 de *Crotalus durissus terrificus*. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP, 2013.

QUICK A.J. On the relationship between complement and protrombin. **I imunologi**. P 87-97, 1935.

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. et al. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research, London**, v. 34, p. 621-626, 2001.

RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; ALENCAR, D.B.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 2, p. 224-231, 2009a.

RODRIGUES, J.A.G. , BEZERRA-NETO, J.T.B. , PONTES, G.C. , FARIAS, W.R.L. Análise de metodologias na precipitação de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh. **Rev. Bras. Enga. Pesca** 4(1), jan. 2009b.

RODRIGUES, J.A.G. ; FARIAS, W.R.L. Avaliação comparativa dos polissacarídeos sulfatados extraídos de rodofíceas *Halymenia* spp.: Ferramenta Taxonômica para Algas. **Rev. Bras. Enga. Pesca** 4(1), jan. 2009c.

RODRIGUES, J.A.G. ; FARIAS, W.R.L. Purificação e atividade anticoagulante in vitro de galactanas sulfatadas extraídas da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Rev. Bras. Enga. Pesca** 3 (2) julho, 2008.

RODRIGUES, J.A.G., VANDERLEI, E.S.O. , QUINDERÉ, A.L.G., FONTES, B.P., BENEVIDES, N.M.B. Polissacarídeos sulfatados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, fracionamento e atividade anticoagulante. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* Maringá, v. 32, n. 2, p. 113-120, 2010.

Shin HC, Hwang HJ, Kang KJ, Lee BH 2006. An antioxidative and antiinflammatory agent for potential treatment of osteoarthritis from *Ecklonia cava*. **Arch Pharm Res** 29: 165-171.

Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SOARES, C.M. Estudo químico da alga *Lithothamnion calcareum* e avaliação da atividade inibitória do rolamento de leucócitos. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Minas Gerais.

SOUZA, L.A.R. ; AZEVEDO, T.C.G. ; SILVA, F.R.F. ; CARDOSO, M.L. ; XAVIER, C.A.C. ; ROCHA, H.A.O. ; DORE, C.M.P.G. ; LEITE, E.L. Caracterização química e ação farmacológica de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha *Amansia multifida*. **Infarma**, v.19, nº 3/4, 2007.

SZE, P. A biology to the algae. New York: McGraw-Hill, 1997- 3rd Edition

Verbruggen, H., De Clerck, O., Kooistra, W.H.C.F. & Coppejans, E. Molecular and morphometric data pinpoint species boundaries in *Halimeda* section *Rhipsalis* (Bryopsidales, Chlorophyta). **Journal of Phycology** 41: 606-621, 2005.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C. Fundamentos de bioquímica. Porto Alegre: Artmed, 2000.

Wu, N., Ye, X., Guo, X., Liao, N., Yin, X., Hu, Y., Sun, Y., Liu, D., Chen, S. "Depolymerization of fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber, *Pearsonothuria graeffei*, via 60 Co irradiation." **Carbohydrate polymers**, v. 93, n. 2, p. 604-614, 2013.

ZHANG, H. J.; MAO, W. J.; FANG, F.; LI, H. Y.; SUN, H. H.; CHEN, Y.; QI, X. H. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated

polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 3, p. 428-434, 2003.