

ISMAEL NILO LINO DE QUEIROZ

**ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS
DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gelidiella acerosa* (FORSSKÅL) FELDMANN &
G. HAMEL COLETADA NAS PRAIAS DOS MUNICÍPIOS DE FLEXEIRAS E
PARACURU DO LITORAL CEARENSE**

Trabalho Supervisionado –
Modalidade A – Monografia –
submetido à Coordenação do Curso
em Engenharia de Pesca, da
Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para
obtenção do título de Engenheiro de
Pesca.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Norma Maria
Barros Benevides

**FORTALEZA
2010**

ISMAEL NILO LINO DE QUEIROZ

**ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS
DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gelidiella acerosa* (FORSSKÅL) FELDMANN &
G. HAMEL COLETADA NAS PRAIAS DOS MUNICÍPIOS DE FLEXEIRAS E
PARACURU DO LITORAL CEARENSE**

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Aprovada em 21/06/2010.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª Dra. ~~NORMA~~ MARIA BARROS BENEVIDES (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^ª Dra. ~~MARJORY~~ LIMA HOLANDA (Membro)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^ª Dra. MARIA GONÇALVES PEREIRA (Membro)
Universidade Estadual do Ceará-UECE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- Q44a Queiroz, Ismael Nilo Lino de.
Atividade antitrombótica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa* (FORSSKAL) FELDMANN & G. HAMEL coletada nas praias dos municípios de Flexeiras e Paracuru do litoral cearense / Ismael Nilo Lino de Queiroz. – 2010.
42 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2010.
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.
1. *Gelidiella acerosa*. 2. Análises química e bioquímica. 3. Efeito antitrombótico. 4. DEAE-celulose. 5. Análise estatística. 6. TTPA. I. Título.

CDD 639.2

AGRADECIMENTOS

A professora Norma Maria Barros Benevides pela orientação deste trabalho, por ter cedido seu laboratório onde realizei todos os experimentos da minha monografia e outros trabalhos que enviei para congressos e eventos de caráter científico e o apoio em todas as minhas atividades que me ajudaram a crescer na vida acadêmica, pela as ajudas de custo que me proporcionaram estágios em outros laboratórios e a quem eu estimo muito e desejo que possa sempre ser esta ótima pessoa e que venha ainda a proporcionar a outros estudantes de graduação e pós-graduação a oportunidade de conhecer este trabalho e despertar o desejo de trabalhar na área de pesquisa e ensino como eu aprendi.

Por sempre estar disposta a tirar as minhas duvidas em alguns experimentos e na correção e sugerindo mudanças nos resumos que fiz e com sua ajuda tive a possibilidade de realizar um trabalho de pesquisa no Rio de Janeiro sob a orientação do professor Paulo Antônio de Souza Mourão onde aprendi novas metodologias e fiz novos amigos e contatos para trabalhos futuros.

A professora Maria Gonçalves Pereira, membro desta banca que me ajudou em muitos trabalhos e me possibilitou aprender a usar os métodos de trombose venosa sem o qual não poderia ter feito este trabalho e sempre me incentivando a buscar novos experimentos ampliando meu conhecimento.

A professora Márjory Lima Holanda, membro desta banca que me ensinou durante a graduação na disciplina de Bioquímica, por ter me apresentado a professora Norma com a qual trabalho até hoje, por sua contribuição nesse trabalho e por sua amizade.

Ao prof. Francisco Hiran Farias Costa, pela contribuição no meu ensino durante a graduação e pelo apoio oferecido num momento de angústia.

Ao mestre José Ariévilo Gurgel Rodrigues que sempre se dispôs a ajudar em experimentos quando eu precisava, quando me vinha alguma dificuldade, pela ajuda em trabalhos e resumos para congressos e sua grande amizade cativante.

Aos professores Paulo Antônio de Souza Mourão e Mauro Sérgio Gonçalves Pavão por terem cedido seus laboratório no período em que estava estagiando na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob orientação do professor Paulo Mourão onde aprendi bastante e encontrei novas perspectivas de trabalho.

Aos Professores Alexandre Holanda Sampaio e Benildo de Sousa Cavada por me iniciarem na pesquisa com algas e mostrarem como se trabalhar, me cedendo um espaço no seu laboratório durante o tempo em que fiquei ante de ir começar a trabalhar com a professora Norma.

A professora Ana Cecília Menezes Forte Xavier e sua bolsista Luanda Pereira Soares pela ajuda na identificação e classificação da alga.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Pesca pela contribuição de seu conhecimento durante minha graduação que contribuiu para a minha formação e conclusão desse trabalho em especial, aos professores José Wilson Calíope de Freitas, Moisés Almeida de Oliveira e Silvana Saker Sampaio, pela contribuição que me deram durante minha vida acadêmica, sua amizade e apoio durante o período em que estive fazendo este trabalho,

tirando dúvidas e me auxiliando na resolução de certos problemas, não tenho formas de agradecer por tudo isso.

A Tia Ana Castelo Melo, Luana Maria Castelo de Melo Silva e toda sua família por terem me recebido tão bem, pela ajuda, o carinho que deram durante minha estada no Rio sem o qual não sei se seria possível eu realizar meu trabalho lá, que Deus sempre a abençoe e lhe proporcione muita saúde, paz e essa enorme alegria e carisma que ela transmite a todos ao seu redor.

Ao pessoal do Lab. 1000 (agora Carbolec) pela ajuda, a amizade, respeito e companheirismo que me fazem ter uma enorme satisfação em trabalhar lá, especialmente Ana Luíza Gomes Quinderé, Bruno Pedrosa Fontes, pela ajuda com os animais, muito obrigado pela paciência, ajuda e sugestões; Érika Bessa, Ticiane Abreu, Ticiane de Lima, Natássia Ribeiro, Edfrank Vanderlei (Garibalde), Ianna Fernandes, Gabriela de Paula, Chistiane Coura, Ygor Eloy, Gardênia Prado, Willame Silva, Trycia Magalhães, Jane Texeira e Gabrielle Macielpela amizade, sugestões, críticas e apoio durante todo esse período.

Aos amigos do curso pelo apoio e ajuda durante minha jornada nesse trabalho, tanto nos momentos difíceis com nos alegres, em especial Tatyane Pereira, Roberlene de Castro, Elisabeth Gomes, Izabel Kalene, Lana Leite, Fabiana, Elisângela, Alice, Carine, Erivaldo (Vavaldo) e todos os outros que se fosse escrever o nome de cada um daria muitas páginas.

A minha família que tem me ajudado até hoje em especial as minhas mães Maria José Alves Lino, Maria Osmarina Alves Lino, Maria Astrídia Alves Lino que me deram e dão todo apoio nessa minha jornada e devo minha gratidão, aos meus tios Francisca Viena Alves Lino e João Ferreira Cavalcante que também sempre me ajudaram e me acolheram em sua casa e também ao meu pai Daniel e a tia Suzana por sempre me apoiarem em tudo.

Ao HEMOCE – Centro Hemoterapia do Ceará, pelo fornecimento de sangue humano para a realização de ensaios de coagulação *in vitro*.

A Universidade Federal do Ceará, através dos Departamentos de Biologia e Bioquímica e Biologia Molecular, cujos laboratórios foram utilizados para realizar meus experimentos e também pelas ajudas de custo em congressos.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro, através do Instituto de Bioquímica Médica, Laboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, onde realizei alguns experimentos.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelas constantes ajudas de custo e bolsa de Iniciação Científica (PIBIC).

Ao Renorbio – Rede Nordeste de Biotecnologia pela bolsa concedida, assim como os constantes auxílios a pesquisa e aos projetos desenvolvidos pelo Laboratório de Algas Marinhas II (Carbolec).

RESUMO

O interesse no isolamento de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividades anticoagulante e antitrombótica são justificados por eventos de trombose, dos efeitos adversos da heparina, uma droga amplamente utilizada na prevenção e no tratamento de doenças tromboembólicas. Somando a isso os polissacarídeos sulfatados (PS) tem despertado um largo interesse em diversos campos das ciências médicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antitrombótica dos PS obtidos da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa*, coletada em bancos naturais de algas no Estado do Ceará (praias de Flecheiras e Pacaruru). Polissacarídeos Sulfatados Totais (PST) de ambas as praias foi extraído tampão acetato de sódio (pH 6,0) contendo cisteína e EDTA (5mM) e papaína bruta, fracionado por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose eluindo com tampão acetato 50m M pH 5,0, contendo diferentes concentrações de NaCl (0,25, 0,50, 0,75, 1,00 e 1,25M). As frações Ga obtidas foram caracterizadas por eletroforese em gel de agarose à 0,5% e, em seguida, sua composição química determinada. A atividade antitrombótica foi avaliada usando um modelo experimental de trombose venosa em ratos pesando entre 200 e 250 g (CEPA-UFC 58/2007). Os rendimentos do PST foram de 1,43 e 1,41% de Flecheiras e Paracuru, respectivamente. Os perfis cromatográficos mostraram a separação em cinco diferentes frações sulfatadas (GaI, GaII, GaIII, GaIV e GaV), eluídas com concentrações de 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 e 1,25 M de sal, respectivamente e revelando, por eletroforese, características moleculares similares com relação as densidades de carga negativa e grau de sulfatação. No entanto, a composição química dos carboidratos totais (CT) nos PST e nas frações Ga obtidas para as duas localidades (Flecheiras e Paracuru) mostrou percentuais de CT variando de 1,8-97,0% e 2,1-80,0%, respectivamente e com relação ao SL (Sulfato Livre), variando de 0,4-42,4% e 10,1-40,5%, respectivamente, onde as frações GaII e GaIV apresentou maiores teores (SL e CT) para ambas as localidades. As frações foram testadas quanto a sua atividade anticoagulante *in vitro* pelo teste de TTPA. Contudo só a fração GaIV teve um leve aumento no tempo de coagulação na dose de 1,0 mg.kg⁻¹, sendo então avaliada em um modelo de trombose venosa, onde a fração de ambas as praias foram capazes de inibir a trombose de forma significativa e dose-dependente (p<0,05). Os maiores efeitos da inibição do trombo foram de 83,4 e 94,4% (Flecheiras e Paracuru, respectivamente) na dose de 1,0 mg.kg⁻¹ de peso corporal. Portanto, o PS isolado da alga vermelha *G. acerosa* pode ser considerada uma fonte interessante de novos agentes antitrombóticos a ser explorada.

Palavras –Chave: *Gelidiella acerosa*, Análises Química e Bioquímica, Efeito Antitrombótico, DEAE-celulose, Análise Estatística, TTPA.

ABSTRACT

The interest in the isolation of sulfated polysaccharides from seaweed with anticoagulant and antithrombotic activities are justified by events of thrombosis, the adverse effects of heparin, a widely used drug in the prevention and treatment of thromboembolic diseases. Adding to that sulfated polysaccharides (PS) has attracted a wide interest in various fields of medical sciences. The aim of this study was to evaluate the antithrombotic activity of PS obtained from red seaweed *Gelidiella acerosa*, collected from natural beds of algae in the State of Ceará (beaches of Flecheiras and Pacaruru). Total sulfated polysaccharides (PST) from both beaches was extracted sodium acetate buffer (pH 6.0) containing cysteine and EDTA (5mM) and crude papain, fractionated by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose column with acetate buffer eluindo 50m M pH 5.0, containing different concentrations of NaCl (0.25, 0.50, 0.75, 1.00 and 1.25 M). Ga fractions obtained were characterized by gel electrophoresis on 0.5% agarose and then determined their chemical composition. The antithrombotic activity has been evaluated using an experimental model of venous thrombosis in rats weighing between 200 and 250 g (CEPA-UFC 58 / 2007). Proceeds from the PST were 1.43 and 1.41% and Flecheiras Paracuru respectively. The chromatographic profiles showed the separation into five different fractions of sulfated (GaI, GaII, GaIII, GaIV and GaV), eluted with concentrations of 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 and 1.25 M salt, respectively, and revealed by electrophoresis, molecular characteristics similar in the densities of negative charge and degree of sulfation. Yet the chemical composition of total carbohydrates (TC) in the PST and Ga fractions obtained for both locations (Flecheiras and Paracuru) showed percentages ranging from 1.8 to 97.0% and 2.1-80.0% CT, respectively, with respect to SL (Sulfate Free) ranging from 0.4 to 42.4% and 10.1 to 40.5%, respectively, where the fractions GaII and GaIV showed higher levels (SL and TL) to both locations. The fractions were tested for their anticoagulant activity in vitro by the APTT. However, only a fraction GaIV had a slight increase in clotting time at a dosage of 1.0 mg.kg⁻¹, and then assessed in a model of venous thrombosis, where the fraction of both beaches were able to inhibit thrombosis in a significant and dose-dependent (p <0.05). The major effects of inhibition of thrombus were 83.4 and 94.4% (Flecheiras and Paracuru, respectively) at a dose of 1.0 mg.kg⁻¹ of body weight. Therefore, the PS isolated from red alga *G. acerosa* may be considered an interesting source of new antithrombotic agents to be explored.

Keywords: *Gelidiella acerosa*, Chemical and Biochemical Analysis, antithrombotic effect, DEAE-cellulose, Statistical Analysis, APTT.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1	Cascata de coagulação onde as duas vias convergem para um ponto em comum (ativação do fator X em Xa) culminando na ativação de protrombina em trombina que cliva o fibrinogênio em fragmentos de fibrina que se polimerizam com as plaquetas formando o tampão hemostático ou coágulo.	16
Figura 2	Exemplar da alga marinha vermelha <i>Gelidiella acerosa</i> (FORSSKÅL) FELDMANN & G. HAMEL	22
Figura 3	Foto do modelo experimental de trombose venosa em ratos.	28
Figura 4	Cromatograma dos PS da alga marinha vermelha <i>Gelidiella acerosa</i> coletada nas Praias de Flecheiras (A) e Praia de Paracuru (B) em coluna de troca iônica (DEAE-celulose). A coluna foi equilibrada e lavada com tampão AcNa 0,05 M. Os polissacarídeos adsorvidos no gel, foram eluídos com mesmo tampão, contendo NaCl em diferentes concentrações (0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25 M). As frações eluídas foram monitoradas por metacromasia com azul-dimetilmetileno a 525 nm. (●—●); perfil de açúcares totais a 492 nm (◆—◆).	30
Figura 5	Eletoforese em gel de agarose das frações PST e Gas da alga marinha vermelha <i>Gelidiella acerosa</i> coletada na Praia de Flecheiras (A) e Paracuru (B).	33
Figura 6	Efeito da fração GaIV isolada da alga marinha vermelha <i>G. acerosa</i> coletada nas Praias de Flecheiras (A) e Paracuru (B) usando um modelo de estase de trombose na veia cava de ratos. Diferentes doses da fração dos dois locais foram administradas intravenosamente e comparadas ao grupo controle. A média do peso do trombo foi obtida através da média dos pesos de cada dose. A inibição foi apresentada em porcentagem, quando na presença e ausência da GaIV. Os valores dos trombos (média ± D.P.M.) está expressa em função da concentração de polissacarídeo em mg.kg ⁻¹ .	36

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Classificação Sistemática, segundo website Algaebase e REVIERS, 2006.	23
Tabela 2. Rendimento e composição química dos PST e frações Ga obtidas por cromatografia em coluna de DEAE-celulose de <i>G. acerosa</i> coletada nas Praias de Flecheiras e Paracuru.	32
Tabela 3. Atividade anticoagulante das frações polissacarídicas obtidas por cromatografia em DEAE-celulose da alga <i>G. acerosa</i> .	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs.	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
Ca ⁺²	Íon Cálcio
CarboLec	Laboratório de Carboidratos e Lectinas
CEPA-UFC	Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará
CETLAVON	Brometo de Cetilmetilamônio
CCP	Cloreto de Cetilpiridínio
Cm	Centímetro
CT	Carboidratos Totais
DEAE- celulose	Dietilaminoetil-Celulose
DMB	Azul de 1,9-Dimetilmetileno
D. P. M	Desvio padrão da Média
EDTA	Ácido Etildiaminotetracético
Fra.	Frações
HCl	Ácido Clorídrico
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
kDa	Kilodalton
Kg	Kilograma
Mg	Miligrama
Min.	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sódio
Nm	Nanômetros
PS	Polissacarídeos Sulfatados
PST	Polissacarídeos Sulfatados Totais
pH	Potencial Hidrogeniônico
SL	Sulfato Livre
t-PA	Plasminogênio Tecidual
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Materiais	22
2.1.1 Alga Marinha	22
2.1.2 Animais	23
2.1.3 Sangue Humano	23
2.1.4 Outros Materiais	24
2.2 Métodos	24
2.2.1 Extração dos Polissacarídeos Sulfatados	24
2.2.2 Fracionamento das GS por Cromatografia de Troca Iônica (DEAE-celulose)	25
2.2.3 Caracterização Química e Bioquímica dos Polissacarídeos Sulfatados	25
2.2.3.1 Eletroforese em Gel de Agarose	25
2.2.3.2 Determinação de Carboidratos Totais	26
2.2.3.3 Determinação do Teor de Sulfato	26
2.2.3.4 Determinação de Proteínas	26
2.2.4 Atividade Anticoagulante e Antitrombótica	27
2.2.4.1 Atividade Anticoagulante	27
2.2.4.2 Atividade Antitrombótica	27
2.2.5 Análise Estatística	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1 Obtenção dos Polissacarídeos Sulfatados Totais	29
3.2 Fracionamento por Cromatografia de Troca Iônica	29
3.3 Análises Químicas	31
3.4 Eletroforese em Gel de Agarose	32
3.5 Ensaios Anticoagulantes	34
3.6 Atividade Antitrombótica	35
4. CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40

**ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA DOS POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS DA ALGA MARINHA VERMELHA *Gelidiella acerosa* (FORSSKÅL)
FELDMANN & G. HAMEL COLETADA NAS PRAIAS DOS MUNICÍPIOS DE
FLEXEIRAS E PARACURU DO LITORAL CEARENSE**

ISMAEL NILO LINO DE QUEIROZ

1 INTRODUÇÃO

Viagens longas aumentam em até três vezes o risco de tromboembolismo venoso, condição que pode envolver trombose venosa profunda e embolia pulmonar. É o que aponta uma revisão científica de 14 estudos, que considerou 4.055 casos, publicada no "Annals of Internal Medicine" por pesquisadores da Escola de Saúde Pública de Harvard. A cada duas horas de viagem por meio terrestre, como ônibus ou trem, os riscos aumentam 18%. Já durante um voo, as chances de o problema ocorrer crescem 26% a cada duas horas. Segundo o trabalho, estima-se que haja um caso de trombose durante uma viagem a cada 4.600 voos. Os principais aeroportos brasileiros registram cerca de 2.000 voos regulares por dia, segundo a Infraero. "Esse risco absoluto é relevante para guiar decisões públicas e individuais sobre prevenção", dizem os autores do levantamento. A trombose venosa profunda, prevalente em 3% da população brasileira, ocorre quando um coágulo (também chamado de trombo) obstrui uma veia profunda e impede ou dificulta parcialmente a passagem de sangue na região (SILVEIRA, 2009).

Em virtude disso, drogas antitrombóticas são extensivamente utilizados na terapia contra doenças cardiovasculares e a heparina é o agente terapêutico mundialmente utilizado na terapia inicial de eventos de pós-operatório e pós-traumático (MOURÃO; PEREIRA, 1999). Já os anticoagulantes são utilizados para prevenir trombose venosa profunda ou a extensão de uma trombose já estabelecida, embolia pulmonar, coagulação em circulação extracorpórea e infarto do miocárdio em pacientes com angina instável (RANG *et al.*, 2007).

A trombose é um efeito adverso incomum relacionado à trombocitopenia induzida por heparina causada por anticorpos contra complexos heparina - fator plaquetário-4. A ligação de anticorpos a este complexo leva à formação de lesões imunológicas nas paredes dos vasos, trombose e coagulação intravascular disseminada (RANG *et al.*, 2007).

O trombo em si refere-se a um coágulo anormal que se desenvolve no interior de um vaso sanguíneo. Uma vez formado o coágulo, o fluxo de sangue que passa por ele tende a deslocá-lo de sua fixação, de modo que o coágulo passa a circular, juntamente com o sangue.

Esses coágulos de fluxo livres são denominados êmbolos. Por conseguinte, os êmbolos que se originam em grandes artérias ou do lado esquerdo do coração fluem periféricamente e causam obstrução das artérias, ou arteríolas, no cérebro, nos rins ou em outros locais. Os êmbolos que se originam no sistema venoso ou no lado direito do coração fluem nos vasos do pulmão, causando embolia pulmonar (GUYTON; HALL, 2002 apud PEREIRA, 2005, p. 34).

A hemostasia refere-se à interrupção da perda de sangue a partir de um vaso lesado. De início, as plaquetas aderem a macromoléculas nas regiões subendoteliais do vaso sanguíneo lesado; em seguida, sofre agregação para formar um tampão hemostático primário. As plaquetas estimulam a ativação local dos fatores de coagulação plasmáticos, levando à formação de um coágulo de fibrina que reforça o agregado plaquetário. (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2005, p. 1141)

A coagulação sanguínea é a conversão do sangue fluido em um gel sólido ou coágulo. O evento principal é a conversão de fibrinogênio solúvel em fibras insolúveis de fibrina por ação da trombina, o último passo de uma cascata enzimática. A trombina converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina através da clivagem dos fibrinopeptídios A (16 resíduos de aminoácidos) e B (16 resíduos de aminoácidos) das extremidades aminoterminais das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$, respectivamente, produzindo fragmentos que se polimerizam para formar fibrina (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2005, p 1141).

Existem duas vias principais na formação de fibrina, a via intrínseca e a via extrínseca, que convergem para o ponto em que o fator X é ativado e esse fator ativa a trombina que é então utilizada para quebrar o fibrinogênio em fragmentos de fibrina, que se polimerizam com as plaquetas formando o tampão hemostático ou coágulo. Evidências mais recentes demonstram que a via extrínseca é crítica para o início da coagulação, enquanto a via intrínseca é importante no crescimento e na manutenção do coágulo (PEREIRA, 2002).

A via extrínseca, é iniciada por uma lesão tecidual que resulta na ativação do fator VII (único fator exclusivo desta via) em fator VIIa, na presença de Ca^{2+} . Os outros fatores desta via (X, V, II e I) são compartilhados com a via intrínseca. Todos os componentes da via intrínseca estão presentes no sangue, sendo exclusivos desta via os fatores XII, XI, IX e VIII (MELO *et al.*, 2008a; RANG *et al.*, 2007).

Os componentes da cascata de coagulação (chamados fatores) estão presentes no sangue como precursores inativos de enzimas proteolíticas e co-fatores (Figura 1). Estes são ativados por proteólise, sendo as formas ativas designadas pelo sufixo "a". Os fatores XIIa, XIa, IXa e IIa (trombina) são todos serina-proteases (RANG *et al.*, 2007).

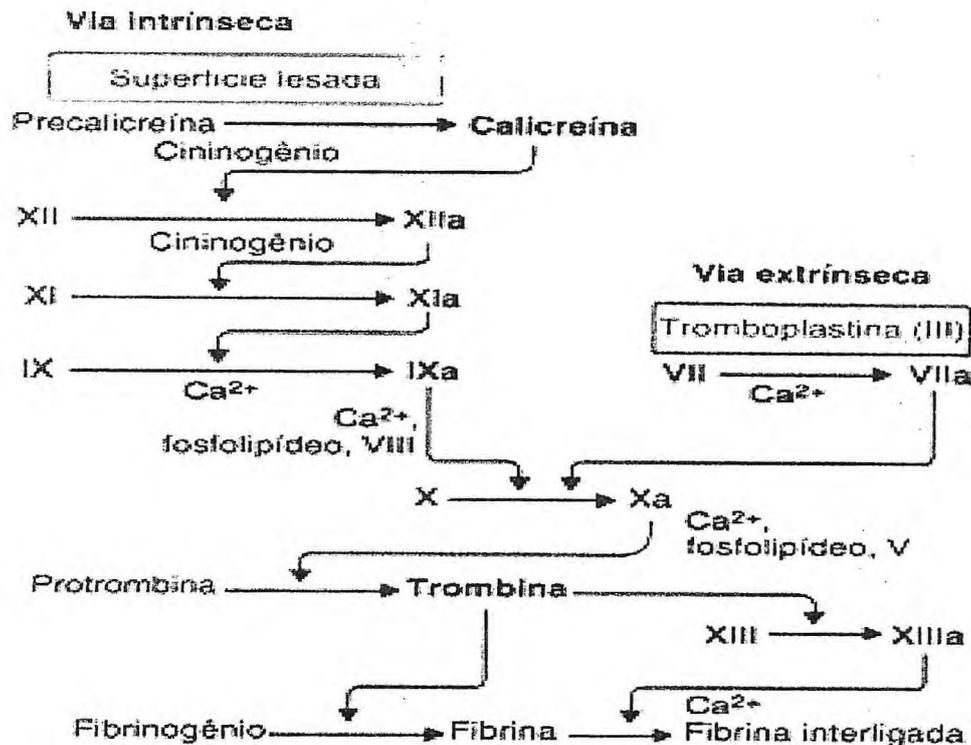


Figura 1 – Cascata de coagulação onde as duas vias convergem para um ponto em comum (ativação do fator X em Xa) culminando na ativação de protrombina em trombina que cliva o fibrinogênio em fragmentos de fibrina que se polimerizam com as plaquetas formando o tampão hemostático ou coágulo.

Os principais inibidores fisiológicos da trombina são a antitrombina e o cofator II da heparina. A antitrombina é um polipeptídeo de cadeia simples glicosilado sintetizado no fígado e que possui massa molecular de cerca de 58 kDa, que inibe rapidamente a trombina apenas na presença da heparina. Sua ação é relacionada à inibição dos fatores da coagulação ativados da via intrínseca e extrínseca, incluindo a trombina e os fatores Xa e o IXa (MAJERUS; TOLLEFESSEN, 2005). O cofator II da heparina é um inibidor específico da trombina e sua atividade é acelerada (mais de mil vezes) na presença de glicosaminoglicanos como a heparina e o dermatan sulfato. A antitrombina também atua sobre outras proteinases do sistema de coagulação (OSLON; BJÖRK, 1992; PEREIRA, 2002).

Os anticoagulantes orais são antagonistas da vitamina K e conseqüentemente interferem nos fatores de coagulação II, VII, IX e X. A warfarina é um dos principais anticoagulantes orais e seu efeito leva vários dias para se desenvolver devido ao tempo necessário para a degradação dos fatores de coagulação pré-formados (RANG *et al.*, 2007). Outros exemplos de anticoagulantes orais são: dicumarol, femprocumona, acenocumarol e derivados da indandiona (MAJERUS; TOLLEFESSEN, 2005).

Entretanto, os fármacos trombolíticos agem dissolvendo os coágulos intravasculares em decorrência da ação da plasmina, uma enzima que digere a fibrina. Dentre os principais anticoagulantes trombolíticos destacam-se: o plasminogênio, a α 2-antiplasmina, a estreptoquinase, o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), a uroquinase e o ácido aminocapróico. Os anticoagulantes antiplaquetários geralmente atuam por mecanismos diferentes e nos últimos anos receberam grandes investimentos. Os principais antiplaquetários comercializados são: ácido acetilsalicílico, que age bloqueando a produção de tromboxano A_2 que é o principal produto da ciclooxigenase nas plaquetas, dipiridamol, clopidogrel, ticlopidina e a tirofibana (MAJERUS; TOLLEFESSEN, 2005).

Dentre os anticoagulantes parenterais (medicamentos que são aplicados por infusão ou injeção e atingem diretamente a corrente sanguínea), destaca-se, além da própria heparina, “o danaparóide, que é uma mistura de glicosaminoglicanos não-heparínicos isolados da mucosa intestinal suína (84% de sulfato de heparan, 12% de sulfato de dermatan, 4% de sulfato de condroitina), com massa média de, 5.500 Daltons” (MAJERUS; TOLLEFESSEN, 2005, p. 1146), trata-se de um anticoagulante eficaz para pacientes com trombocitopenia induzida por heparina. “A lepirudina é um derivado recombinante (Leu¹-Thr²-63-dessulfo-hirudina) da hirudina, um inibidor direto da trombina encontrado nas glândulas salivares da sanguessuga medicinal” (MAJERUS; TOLLEFESSEN, 2005, p. 1146).

As preparações comerciais de heparina (um glicosaminoglicano de mamíferos obtido de pulmão bovino e intestino de porco), por outro lado, também levam a diversos outros eventos colaterais. O composto é naturalmente obtido a baixos rendimentos, existindo também o risco de contaminação viral, já que é obtido de animais (MOURÃO; PEREIRA, 1999; RANG *et al*, 2007), além do insucesso no uso da heparina de baixo peso molecular para evitar episódios de hemorragia (THOMAS, 1997), sendo este último, sem dúvida alguma, seu principal efeito indesejável, dificultando os tratamentos clínicos dos pacientes.

Adicionalmente, alguns relatos já confirmaram a contaminação de preparações de diversas marcas comerciais de heparinas, rotineiramente utilizadas nas cirurgias cardíacas no Brasil. Tal fato poderia ocasionar um aumento significativo no número de casos de discrasia sanguínea, aumento de reincidências cirúrgicas e efeitos adversos em pacientes submetidos à heparinoterapia no País. O baixo padrão de qualidade das heparinas gera a preocupação quanto à segurança de utilização em cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea. A falta de regulamentação específica e o desinteresse dos fornecedores no controle de qualidade da heparina não-fracionada também se fazem uma realidade (MELO *et al.*, 2008).

Neste contexto, diferentes mecanismos anticoagulantes têm sido propostos para os PS isolados de algas marinhas, buscando assim relacioná-los aos da heparina.

As algas são organismos autotróficos de grande importância ecológica (SZE, 1997) que podem ser utilizadas em diversos ramos da biotecnologia (GREENWELL *et al.*, 2008; LEVRING; HOPPE; SCHMID, 1969; NEORI *et al.*, 1996). Encontrados em grandes concentrações nas algas marinhas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967), os polissacarídeos sulfatados (PS) são polímeros de açúcares repetitivos aniônicos que por possuírem propriedades gelificantes, espessantes, emulsificantes e estabilizantes são bastante utilizados nas indústrias de alimentos (HOLANDA, 2007; MARINHO-SORIANO, 2001; MACIEL *et al.*, 2008), farmacêutica (ASSREUY *et al.*, 2008; FARIAS; NAZARETH; MOURÃO, 2001; FONSECA *et al.*, 2008) e outros setores econômicos (ARAÚJO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2009a).

Dentre as atividades biológicas mais estudadas dos PS no mundo, destacam-se as suas ações como agentes anticoagulantes e antitrombóticos. Seus efeitos sobre a coagulação sanguínea não ocorrem meramente como uma função de densidade de cargas, mas também de composição monossacarídica, posição do radical sulfato, dos sítios de sulfatação e, principalmente, da ocorrência de unidades dessulfatadas (FARIAS *et al.*, 2000; FONSECA *et al.*, 2008; MOURÃO, 2004; PEREIRA *et al.*, 2005). Portanto, as características químicas também são pré-requisitos importantes de forma a compreender melhor as relações entre as atividades biológicas e padrões estruturais desses compostos complexos e heterogêneos (FARIAS *et al.*, 2000; MOURÃO; PEREIRA, 1999), e modelos de experimentação animal têm sido ferramentas importantes para averiguar os efeitos de diferentes polissacarídeos no desenvolvimento de novas drogas para o homem (MOURÃO; PEREIRA, 1999; FONSECA *et al.*, 2008).

PS de algas marinhas são macromoléculas de origem não mamália encontrados em grandes concentrações na matriz extracelular desses organismos. Esses compostos estão na forma de fucoidanas (BERTEAU; MULLOY, 2003) nas algas pardas (Phaeophyta) como galactanas nas algas vermelhas (Rhodophyta) e, nas algas verdes (Chlorophyta), os mais comuns são as arabino-galactanas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967).

Dentre esses polissacarídeos sulfatados, as galactanas sulfatadas, em especial, encontradas nas algas marinhas vermelhas em elevadas quantidades, são formadas de galactoses (ou derivados desse monossacarídeo) dispostas em uma cadeia linear composta por unidades dissacarídicas formadas por repetições de β -D-galactose (unidade A) ligada através dos carbonos C-1 ao C-3 da α -galactose (unidade B). Já as unidades dissacarídicas são unidas

através dos carbonos C-1 e C-4. As galactanas formam um arranjo alternado de unidades A e B, ou seja, (AB)_n (PAINTER, 1983) e são componentes da matriz extracelular, desempenhando funções biológicas envolvidas com a osmorregulação e propriedades iônicas e mecânicas, favorecendo a sobrevivência desses organismos no ambiente marinho (KLOAREG; QUATRANO, 1998).

De acordo com a configuração enantiométrica da α -galactose da unidade B, das galactanas, elas são classificadas em carragenanas e as agaranas, sendo L- para agaranas e D- para carragenanas. A unidade A sempre pertence à série D- (USOV, 1984). Estudos estruturais mais detalhados demonstram um terceiro grupo de galactanas, os híbridos D/L, em que as unidades B apresentam configuração D- e L- na mesma molécula (ESTEVEZ; CIANCIA; CEREZO, 2004). Vários outros aspectos quanto à estrutura e o metabolismo de polissacarídeos de algas podem ser encontrados em revisões específicas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967).

Estudos demonstram que a estrutura e a composição química dos PS de algas marinhas variam de espécie para espécie (DIETRICH *et al.*, 1995), da localidade e época do ano de coleta das algas, além da metodologia de extração utilizada (PERCIVAL; McDOWELL, 1967), podendo cada molécula assumir conformação estrutural única e, portanto, apresentar diferentes atividades anticoagulantes de interesse biomédico.

PS de algas marinhas apresentam diversas atividades biológicas, tais como antitumoral (ASSREUY. *et al.* 2008; LINS *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2004), anticoagulante (FARIAS *et al.*, 2000; MATSUBARA *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2010), antiviral (HAYASHI; HAYASHI; KOJIMA, 1996; TALARICO *et al.*, 2005) e imunoestimulante (CHOTIAGET *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009a).

Estudos realizados por Farias *et al.* (2000), utilizando a D-galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*, constataram uma acentuada atividade anticoagulante desse polissacarídeo, a qual foi mediada pela inibição da trombina via antitrombina e cofator II da heparina, pela presença de dois ésteres de sulfato em um único resíduo de galactose. A posição do radial sulfato na estrutura química também sugere ser importante para expressar tal ação. Quando essa mesma galactana foi avaliada em modelo de trombose venosa, foi averiguada uma potente atividade antitrombótica, quando a dose de 0,2 mg.kg⁻¹ exerceu um efeito significativo de 75% na inibição de trombos em ratos (FARIAS; NAZARETH; MOURÃO, 2001).

Matsubara *et al.* (2001) relataram que o PS isolado da alga marinha verde *Codium cylindricum* possui um mecanismo inibitório direto sobre a trombina independente da antitrombina III e cofator II da heparina.

Mais recentemente, Fonseca *et al.* (2008) realizaram um estudo comparativo, entre duas galactanas sulfatadas isoladas das rodofíceas *B. occidentalis* e *Gelidium crinale*. Os resultados mostraram que o efeito dessas moléculas sobre a coagulação sanguínea ocorre por meio de suas características estruturais e químicas, como nas proporções e/ou distribuição dos radicais sulfatos na cadeia, envolvendo mecanismos distintos de interação dessas galactanas entre proteases, inibidores e ativadores do sistema de coagulação. Os autores evidenciaram a ocorrência de efeitos anti- e pró-coagulantes, além das ações anti- e pró-trombóticas desses compostos, quando em diferentes doses em ratos. Portanto, estes PS se apresentam como ferramentas moleculares importantes para distinguir eventos *in vivo* e para conhecer melhor a fisiologia da coagulação sanguínea e a fisiopatologia das doenças tromboembólicas.

Rocha *et al.* (2005), utilizando uma galactofucana isolada da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* (Dictyotale), mostraram que esse polímero, mesmo a molécula apresentando elevada densidade de cargas negativas na sua estrutura química, não apresentou atividade anticoagulante *in vitro*, porém exibiu uma ação antitrombótica *in vivo* de forma tempo-dependente.

A maior parte dos agentes que possui atividade anticoagulante *in vitro* apresenta propriedades antitrombóticas *in vivo*, no entanto, em alguns casos não há uma relação clara entre o efeito anticoagulante *in vitro* ou *ex-vivo* e a eficácia antitrombótica. Alguns agentes podem prolongar o tempo de coagulação *in vitro* e não apresentar efeito *in vivo* (LEVI *et al.*, 2001).

Deste modo, as pesquisas demonstram que a identificação e purificação de um novo PS criam sempre uma perspectiva para a realização de diferentes ensaios biológicos no desenvolvimento de um novo fármaco a ser utilizado na clínica médica em terapias cardiovasculares como a trombose.

A alga marinha vermelha *G. acerosa* (Forsskål) Feldman & Hamel é nativa do litoral do Estado do Ceará. Essa espécie biossintetiza uma agarana com excelentes propriedades reológicas e físico-químicas de grande interesse para indústria de alimentos (GANZON-FORTES, 1985; KAMALESH PRASAD *et al.*, 2005; KAMALESH PRASAD *et al.*, 2007; RAMAVATAR MEENA; ROLEDA *et al.*, 1997). Estudos anteriores também demonstraram a utilização do seu extrato bruto como agente contraceptivo em ratas grávidas

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Alga Marinha

A alga marinha vermelha *G. acerosa* (Figura 2) foi classificada, segundo website www.algaebase.com e Reviere (2006) (Tabela 1), onde um exemplar está registrado sob n° de exsicata 046094 no Herbário Prisco Bezerra. A alga foi coletada nas praias cearenses de Flecheiras, município de Trairi - CE, e Pedra Rachada, município de Paracuru - CE, durante a maré baixa. Posteriormente, conduzida em caixas isotérmicas e estocada (-20 °C) no Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. No laboratório, as algas foram limpas para a retirada de epífitas e/ou organismos incrustantes, lavadas com água destilada, secas à temperatura ambiente (25 °C) e armazenadas para posterior uso.

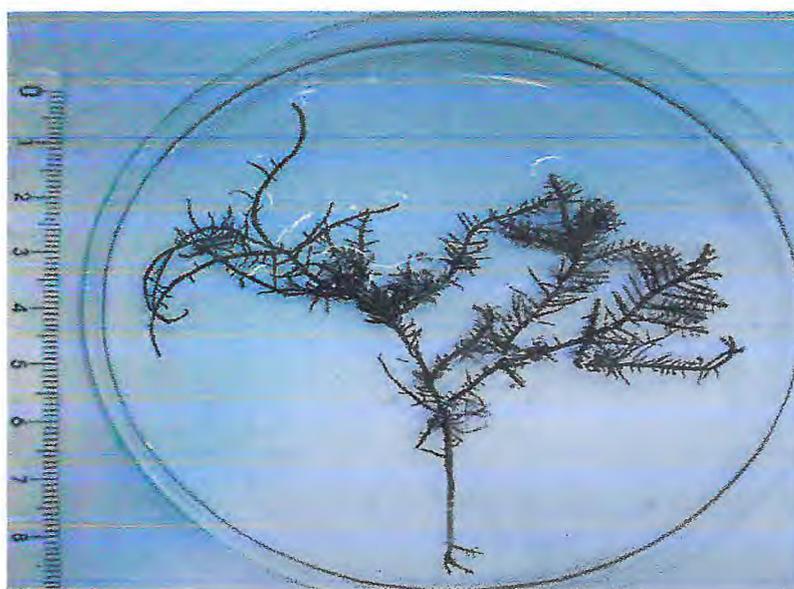


Figura 2 - Exemplar da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa* (FORSSKÅL) FELDMANN & G. HAMEL.

Tabela 1 - Classificação Sistemática, segundo website Algaebase e REVIERS, 2006.

Classificação Filogenética	
Reino:	Plantae
Subreino:	Biliphyta
Filo:	Rhodophyta
Subfilo:	Eurhodophytina
Classe:	Florideophyceae
Subclasse:	Rhodymeniophycidae
Ordem:	Gelidiales
Família:	Gelidiellaceae
Gênero:	<i>Gelidiella</i>
Espécie:	<i>Gelidiella acerosa</i>

Fonte: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=1865

2.1.2 Animais

Ratos *Wistar* machos foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular para utilização, até atingirem o peso ideal (200 e 250 g). A autorização para uso dos animais nos experimentos *in vivo* foi registrada junto à Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA-UFC), sob parecer de número 58/2007.

2.1.3 Sangue Humano

O sangue de humano normal citratado (diferentes doadores) foi obtido do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

2.1.4 Outros Materiais

Acetato de sódio trihidratado, papaína bruta, cloreto de bário, ácido tricloroacético, *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio 0,1% foram obtidos pela Vetec, Agarose da BioAgency, Cloreto de cetilpiridínio e Dietilaminoetil-celulose da Sigma, azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB) da Aldrich Chemical Co., Ácido etildiaminotetracético da QEEL, Tromboplastina da BioMérieux; Kensol (Xilazina a 2%) e Vetanarcol (Ketamina a 5%) da Konig, Reagente TTPA da CLOT, Bios Diagnóstica, *L*-cisteína e demais reagentes de grau analítico foram obtidos comercialmente.

2.2 Métodos

2.2.1 Extração dos Polissacarídeos Sulfatados

Os Polissacarídeos Sulfatados Totais (PST) foram obtidos segundo Farias *et al.* (2000), com algumas modificações. A alga (5 g) desidratada (25 °C) e macerada com nitrogênio líquido, aumentando assim área de contato com o tampão de extração, foi misturada com 250 mL de tampão acetato de sódio (tampão AcNa) 0,1 M (pH 6,0) contendo cisteína e EDTA (5 mM) e 1020 mg de papaína bruta em banho-maria a 60 °C por 6 h. Em seguida, o material foi filtrado em tela de náilon. Ao resíduo foi adicionado 140 mL de água destilada e filtrado novamente. Os filtrados foram reunidos, centrifugado (6.000 × *g*; 4 °C; 20 min.) e ao sobrenadante adicionados 17 mL de uma solução cloreto de cetilpiridínio (CCP) a 10% por 2 h em temperatura ambiente para precipitação dos polissacarídeos. Logo após a precipitação, a mistura foi centrifugada (6.000 × *g*; 4 °C; 20 min.), sendo o sobrenadante descartado. O precipitado obtido foi lavado com 600 mL de CCP a 0,05% e centrifugado nas mesmas condições e posteriormente dissolvido em 150 mL de solução NaCl 2 M: etanol comercial (100:15; v/v). Logo após a dissolução, os PS foram novamente precipitados com a adição de 300 mL de etanol comercial a 4 °C por 24 h. Após esse período de precipitação, o material foi centrifugado e lavado com 300 mL de etanol comercial a 80% (2 ×) e uma vez

com etanol comercial (300 mL). Ao final do processo, o material foi dialisado exaustivamente contra água destilada e liofilizado para obtenção dos PST.

2.2.2 Fracionamento dos PST por Cromatografia de Troca Iônica em DEAE-celulose

Os PST (56 mg) foram dissolvidos em 25 mL de tampão AcNa 50 mM, pH 5,0, e aplicados na coluna de DEAE-celulose previamente equilibrada com o mesmo tampão. Os polissacarídeos adsorvidos no gel foram eluídos, passo a passo, com tampão AcNa 50 mM, pH 5,0, contendo NaCl nas concentrações de 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25 M. As frações de polissacarídeos sulfatadas (PS) eluídas (5,4 mL/tubo) foram monitoradas por meio da propriedade metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno em espectrofotômetro a 525 nm (FARNDAL; BUTTLE; BARRETT, 1986). As frações metacromáticas obtidas foram reunidas, dialisadas e liofilizadas.

2.2.3 Caracterização Química e Bioquímica dos Polissacarídeos Sulfatados

2.2.3.1 Eletroforese em Gel de Agarose

Para caracterização bioquímica dos polissacarídeos sulfatados por obtenção de padrões eletroforéticos de densidade de cargas em grupos sulfatos, os PST e as frações de PS obtidas por cromatografia em DEAE-celulose (40 µg) foram aplicados em gel de agarose a 0,5% em tampão 1,3 - acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0) e a corrida realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min.. Após corrida, o gel foi em colocado em contato com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio 0,1% por 24 h para fixação das bandas de PS, corado com azul de toluidina 0,1% e, finalmente, descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v/v/v), como descrito por Dietrich; Dietrich (1976).

2.2.3.2 Determinação de Carboidratos Totais

Os açúcares totais presentes no PST e nas frações PS foram determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956, modificado por MASUKO *et al.*, 2005). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Armstrong Biosciences Ultrospec 1100 pro) a 492 nm, utilizando a D-galactose como curva-padrão.

2.2.3.3 Determinação do Teor de Sulfato

Os teores de sulfato total dos PST e das frações PS foram determinados após hidrólise ácida (HCl 12 M, 6 h., 105 °C), utilizando o método da gelatina-bário (DODGSON; PRICE, 1962), as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Armstrong Biosciences Ultrospec 1100 pro) a 360 nm, utilizando como curva-padrão o sulfato de sódio.

2.2.3.4 Determinação de Proteínas

Com intuito de avaliar a eficácia da metodologia de obtenção dos PST a detecção de possíveis contaminações protéicas foi realizada pelo método de Bradford (1976). A concentração de proteínas foi estimada em relação a uma curva padrão, obtida com albumina sérica bovina, sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro (Armstrong Biosciences Ultrospec 1100 pro) a 595 nm.

2.2.4 Atividade Anticoagulante e Antitrombótica

2.2.4.1 Atividade Anticoagulante

Na avaliação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) foi realizada, utilizando plasma pobre em plaquetas obtido por centrifugação de sangue de humano normal ($73,75 \times g$; 15 min.). Para a realização do teste, 50 μL de plasma foram incubados a 37 °C por 3 min. com 10 μL de PS e 50 μL do reagente TTPA. Após incubação, foram adicionados 50 μL de cloreto de cálcio 25 mM para ativação da cascata de coagulação. Os ensaios foram realizados em duplicata, sendo o tempo de coagulação registrado automaticamente em um coagulômetro (DRAKE, modelo QUICK-TIMER).

2.2.4.2 Atividade Antitrombótica

Os ensaios de atividade antitrombótica na veia cava de ratos foram conduzidos por uma combinação entre hipercoagulabilidade e estase como descrito por Vogel *et al.* (1989). Foram utilizados ratos *Wistar* machos (200 e 250 g), previamente anestesiados por injeção intramuscular com xilazina 2% ($\sim 3,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) e ketamina 5% ($\sim 5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$). Em seguida, os animais foram abertos cirurgicamente para exposição da veia cava e obtenção de um segmento de 0,7 cm, por incisão na região abaixo da veia renal direita, seguida da incisão abaixo da veia renal esquerda, previamente isoladas com fio de nylon (Figura 3.). Posteriormente, foi injetado, diferentes concentrações da fração GaIV (0,01; 0,10; 0,50; 1,00; 2,00 e 3,00 mg.kg^{-1} do animal, $n=5$) à 0,2 cm abaixo do segmento isolado e deixado circulando por 5 min. antes da indução da trombose. Após esse período, o estado de hipercoagulabilidade foi induzido através da administração intravenosa de Tromboplastina (5,0 mg.kg^{-1} de animal), 0,1 cm abaixo do segmento isolado, seguido do isolamento total do segmento, iniciando na extremidade proximal e finalizando na extremidade distal. Após 20 minutos de estase, o trombo formado foi retirado, seco em estufa (60 °C, 1 h) e pesado. No controle negativo foi injetado salina 0,5 M em substituição ao PS.

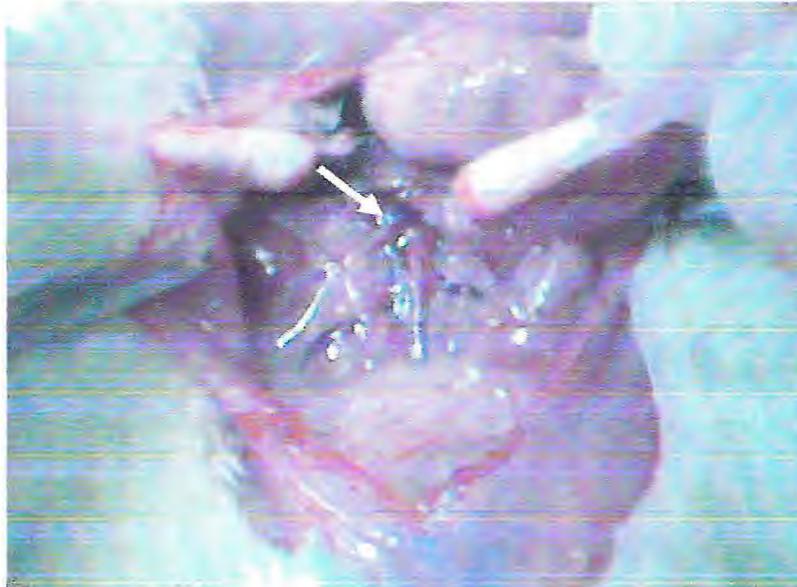


Figura 3 – Foto do modelo experimental de trombose venosa em ratos.

2.2.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm D. P. M. (Desvio Padrão da Média). Para verificação das diferenças estatísticas entre os grupos de animais foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) e, quando observada diferença entre as médias, foi aplicado o teste de Tukey. Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção dos Polissacarídeos Sulfatados Totais

A obtenção do PST da alga marinha vermelha *G. acerosa*, resultou em rendimentos semelhantes nos dois locais (Praia de Flecheiras e Paracuru) e períodos de coleta (1,43 e 1,41%). Rendimentos de PST semelhantes foram obtidos para alga *G. crinale* (2,4%) por Pereira *et al.* (2005) e para a alga *Pterocladia capillacea* (1,6%) por Quinderé, (2008), que também utilizaram, sob as mesmas condições, o procedimento de extração por digestão proteolítica com a papaína.

3.2 Fracionamento por Cromatografia de Troca Iônica

O fracionamento dos PST de *G. acerosa* nas duas diferentes localidades foi realizado, através de cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-celulose, obtendo cinco frações sulfatadas denominadas de GaI, GaII, GaIII, GaIV e GaV eluídas respectivamente com 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 e 1,25 M de NaCl (Figura 4). Os maiores rendimentos e teores de carboidratos totais e grupos sulfatos (Tabela 2) foram obtidos para as frações Ga2 (27,5, 23,4 e 42,4%, respectivamente para Flecheiras e, 41,5, 17,0 e 40,5%, respectivamente para Paracuru) e Ga4 (8,9, 3,3 e 7,9%, respectivamente para Flecheiras e, 13,5, 7,6 e 27,6%, respectivamente para Paracuru).

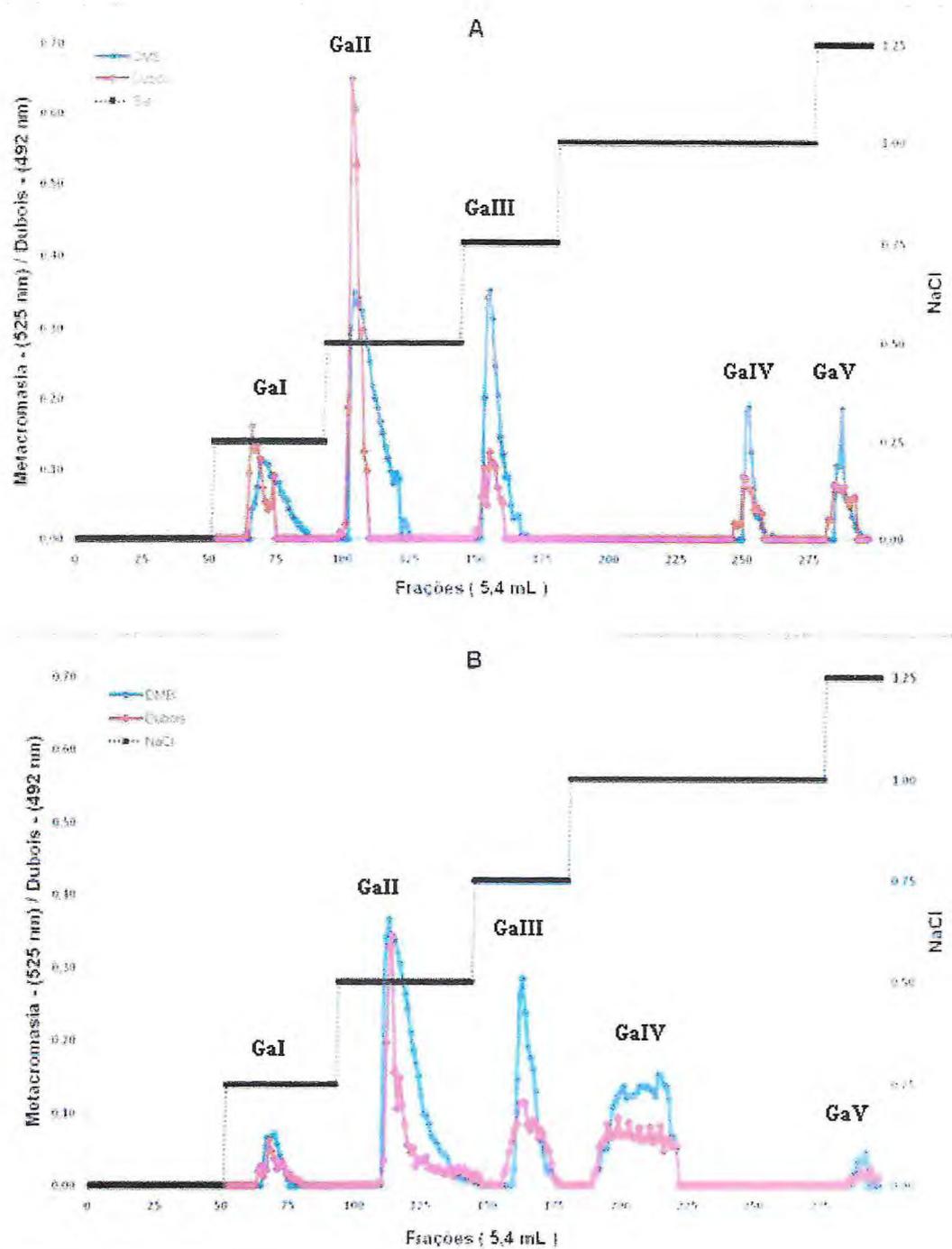


Figura 4 - Cromatograma dos PS da alga marinha vermelha *Gelidium acerosa* coletada nas Praias de Flecheiras (A) e Praia de Paracuru (B) em coluna de troca iônica (DEAE-celulose). A coluna foi equilibrada e lavada com tampão AcNa 0,05 M. Os polissacarídeos adsorvidos no gel foram eluídos com o mesmo tampão, contendo NaCl em diferentes concentrações (0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 1,25 M). As frações eluídas foram monitoradas por metacromasia com azul-dimetilmetileno a 525 nm. (●—●); perfil de açúcares totais a 492 nm (◆—◆)

O emprego de procedimentos cromatográficos, utilizando a matriz de troca iônica DEAE-celulose, tem sido reportado como eficiente no fracionamento de polissacarídeos sulfatados e na revelação de características entre as várias espécies de algas marinhas existentes (PEREIRA *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2009b). Segundo os referidos autores, a eficiência de separação dos polissacarídeos por carga traduz em vantagens, tendo em vista o elevado grau de complexidade e heterogeneidade destes compostos presentes nas diferentes espécies de algas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967), dificultando a sua caracterização estrutural e suas relações com as atividades biológicas (FARIAS *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2005).

3.3 Análises Químicas

Os teores de carboidratos solúveis totais e de grupos sulfato nos PST e nas frações Ga estão representados na Tabela 2. A determinação de carboidratos totais (CT) nos PST e nas frações Ga obtidas para as duas localidades (Flecheiras e Paracuru) mostrou percentuais de CT variando de 1,8-97,0% e 2,1-80,0%, respectivamente e com relação ao SL (Sulfato Livre), variando de 0,4-42,4% e 10,1-40,5%, respectivamente, onde as frações GaII e GaIV apresentou maiores teores (SL e CT) para ambas as localidades.

Desta forma, as diferenças na composição química entre as frações Ga da alga *G. acerosa* pode estar relacionada com a heterogeneidade dessas moléculas. Este fato corrobora com a hipótese de Percival e McDowell (1967), onde foi sugerido que algumas obtenções e fracionamento de polissacarídeos de algas, tais como a extração diferencial, uso de diferentes solventes e emprego de colunas de separação, podem resultar em frações polissacarídicas com propriedades e composições químicas diferentes.

Tabela 2 - Rendimento e composição química dos PST e frações Ga obtidas por cromatografia em coluna de DEAE-celulose de *G. acerosa* coletada nas Praias de Flecheiras e Paracuru.

Região	Frações	Rendimento (%)	Composição Química		
			Carboidratos totais (%)	Sulfato livre (%)	Proteínas*
Flecheiras	PST	100,00	97,0	10,8	-
	GaI	9,8	9,2	7,8	-
	GaII	27,5	23,4	42,4	-
	GaIII	8,6	11,0	7,7	-
	GaIV	8,9	3,3	7,9	-
	GaV	3,4	1,8	0,4	-
Paracuru	PST	100,00	80,6	11,6	-
	GaI	15,7	5,7	11,2	-
	GaII	41,5	17,0	40,5	-
	GaIII	14,1	3,3	10,1	-
	GaIV	13,5	7,6	27,6	-
	GaV	8,4	2,1	11,4	-

* – Não foram detectadas.

A obtenção de teores de sulfato livre para os PST para a alga *Gelidiella acerosa*, biossintetizadora de agarana, das localidades de Flecheiras e Paracuru são considerados mais elevados (10,8-11,6, respectivamente) do que o obtido para as algas do gênero *Gracilaria*, também produtoras de agaranas, como por exemplo, *G. córnea* (4,8%) e *G. birdiae* (6,4%) estudadas por Melo *et al.*, (2002) e Maciel *et al.*, (2008), respectivamente.

Com relação à ausência de proteínas residuais em todas as frações de *G. acerosa* testadas sugere a eficiência da digestão proteolítica pela papaína no processo de obtenção dos polissacarídeos sulfatados (RODRIGUES *et al.*, 2010).

3.4 Eletroforese em Gel de Agarose

O procedimento de eletroforese em gel de agarose (figura 5A e 5B) mostra que os perfis eletroforéticos apresentaram bandas com padrão homogêneo de cargas negativas, sugerindo um considerável grau de purificação, sendo que as maiores densidade de cargas negativas observada para as frações GaII e GaIV. Estes dados reforçam os teores de SL obtidos na tabela 2.

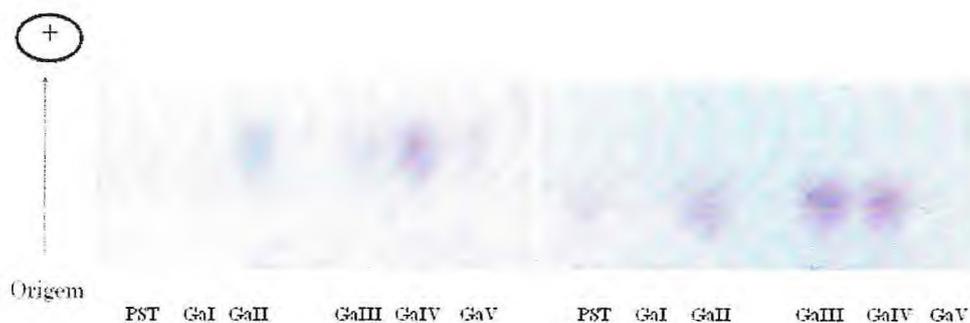


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose das frações PST e Gas da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa* coletada na Praia de Flecheiras (A) e Paracuru (B).

Portanto, esses dados também sugerem que, independente da região de coleta da alga marinha vermelha *G. acerosa*, a espécie é capaz de biossintetizar PS com características moleculares semelhantes. Assim, o padrão homogêneo de cargas negativas dessas moléculas motiva posteriores estudos de caracterização estrutural (FARIAS *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2009b).

Contudo, as características desses compostos também podem variar dentro de uma mesma espécie. Rodrigues *et al.* (2009b) observaram que, no decorrer das extrações consecutivas de PST da rodofíceia *H. pseudofloresia*, foi possível o isolamento desses compostos com menor grau de resolução. A realização de duas novas extrações de PST dessa espécie, a partir do mesmo resíduo algal, propiciou a obtenção de moléculas com maior grau de purificação e rendimento de PST (47,14%). A investigação desta hipótese, também utilizando a espécie *G. acerosa*, poderá contribuir com a obtenção de outros PS para caracterização taxonômica de algas pertencente ao mesmo gênero (RODRIGUES *et al.*, 2010).

3.5 Ensaio Anticoagulantes

Os ensaios anticoagulantes, realizados segundo o teste do TTPA, revelaram que as frações Gas, mesmo a uma concentração elevada de polissacarídeo ($1,00 \text{ mg.mL}^{-1}$), não foram capazes de modificar o tempo normal de coagulação (Tabela 3.), exceto pela F IV que teve um leve aumento no tempo de coagulação na dose de $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$. Desta forma, sugere-se que esses polissacarídeos não promoveram a inibição da via intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação sanguínea como o observado em outros trabalhos (RODRIGUES *et al.*, 2009b; RODRIGUES *et al.*, 2010).

Tabela 3 - Atividade anticoagulante das frações polissacarídicas obtidas por cromatografia em DEAE-celulose da alga *G. acerosa*.

Localidade	Fração	Teste do TTPA*			
		** 0,01 mg.mL ⁻¹	** 0,10 mg.mL ⁻¹	** 0,50 mg.mL ⁻¹	** 1,00 mg.mL ⁻¹
FLECHEIRAS	F I	35,4±0,7	38,2±1,1	38,4±1,5	40,0±0,9
	F II	35,2±0,8	35,6±0,5	37,6±0,7	50,0±1,1
	F III	37,7±1,3	40,0±0,9	48,2±1,6	51,6±2,6
	F IV	37,4±0,6	43,6±0,1	42,4±1,8	40,6±1,1
	F V	34,6±0,4	37,1±1,3	45,1±0,4	44,3±1,0
PARACURU	F I	35,4±0,7	38,2±1,1	51,2±0,2	42,0±1,1
	F II	35,2±0,8	35,6±0,5	47,0±0,2	48,2±1,2
	F III	37,7±1,2	40,0±0,9	48,2±0,6	52,7±1,4
	F IV	37,4±0,6	43,6±0,1	46,2±1,2	71,2±1,8
	F V	34,6±0,4	37,1±1,3	45,2±1,8	54,9±1,4

* TTPA em segundos; ** Concentração de PS; plasma: $46,0 \pm 1,2 \text{ s}$.

Normalmente acredita-se que para um PS poder exercer uma ação antitrombótica *in vivo* é necessário possuir uma atividade anticoagulante *in vitro*, sendo o teste do TTPA uma ferramenta importante de avaliação, pois indica com precisão o potencial anticoagulante do composto isolado (MOURÃO; PEREIRA, 1999).

Por outro lado, já existem relatos na literatura que a ação desses compostos no sistema de coagulação sanguínea não ocorre meramente como uma função de densidade de cargas. A posição de sulfatação, a composição monossacarídica e tipo de ligação glicosídica devem ser considerados como pré-requisitos importantes nos estudos dessas macromoléculas (FARIAS *et al.*, 2000; MOURÃO, 2004).

Recentemente, Rocha e Leite (2008), identificaram três tipos de fucanas (A, B e C) presentes na alga marinha parda *Spatoglossum shroderi*, também destituídas de atividade

anticoagulante *in vitro*, onde curiosamente a fucana A, quando administrada em ratos, impediu a formação de trombos nos animais de forma tempo-dependente. Quando os pesquisadores investigaram seu efeito antitrombótico, observaram que o PS se liga a matriz extracelular das células endoteliais, desencadeando uma via de sinalização que culmina com a síntese de heparan sulfato *in vivo*.

Diante dos resultados obtidos, ou seja, maiores rendimentos de teores de sulfato e maior densidade de carga negativa no procedimento de eletroforese e discreto aumento de atividade anticoagulante para a fração GaIV de *G. acerosa*, esta fração foi a escolhida para dar continuidade ao estudo deste trabalho, representado pelo ensaio de atividade antitrombótica.

3.6 Atividade Antitrombótica *in vivo*

A atividade antitrombótica *in vivo* em ratos utilizando a tromboplastina como estímulo trombogênico. Utilizando a Fração GAIV das duas localidades, causaram efeitos na redução da formação de trombos nos animais (Figura 6). A maior porcentagem de inibição de trombos foi obtida no grupo de ratos que receberam $1,00 \text{ mg.kg}^{-1}$ de massa corpórea (83,4% e 94,4%) quando comparados ao grupo salina (NaCl 0,15 M). As atividades também se expressaram de maneira significativa e dose-dependente (Figuras 6A e B), porém o efeito do Ga IV sobre o trombo foi revertido nas doses de 2,0 e 3,0 mg.kg^{-1} (Figura 6B), ocorrendo um aumento do peso do trombo se aproximando do grupo controle. Os resultados, sugerem um possível efeito pró-trombótico (Figura 6B).

O PS da alga *P. capillacea* não apresentou atividade anticoagulante *in vitro* no ensaio de TTPA, porém apresentou atividade antitrombótica *in vivo* no modelo de trombose venosa em ratos (QUINDERÉ, 2008). Diferentemente, a alga *S. schoederi* apresentou efeito antitrombótico da galactofucana sulfatada somente após um período de 4 h após a sua administração, enquanto o PS da *P. capillacea* apresentou atividade após 25 min. Da mesma forma, as frações F IV obtidas da *G. acerosa* de ambas as regiões não apresentaram atividade anticoagulante e apresentaram atividade antitrombótica 25 min. após sua administração.

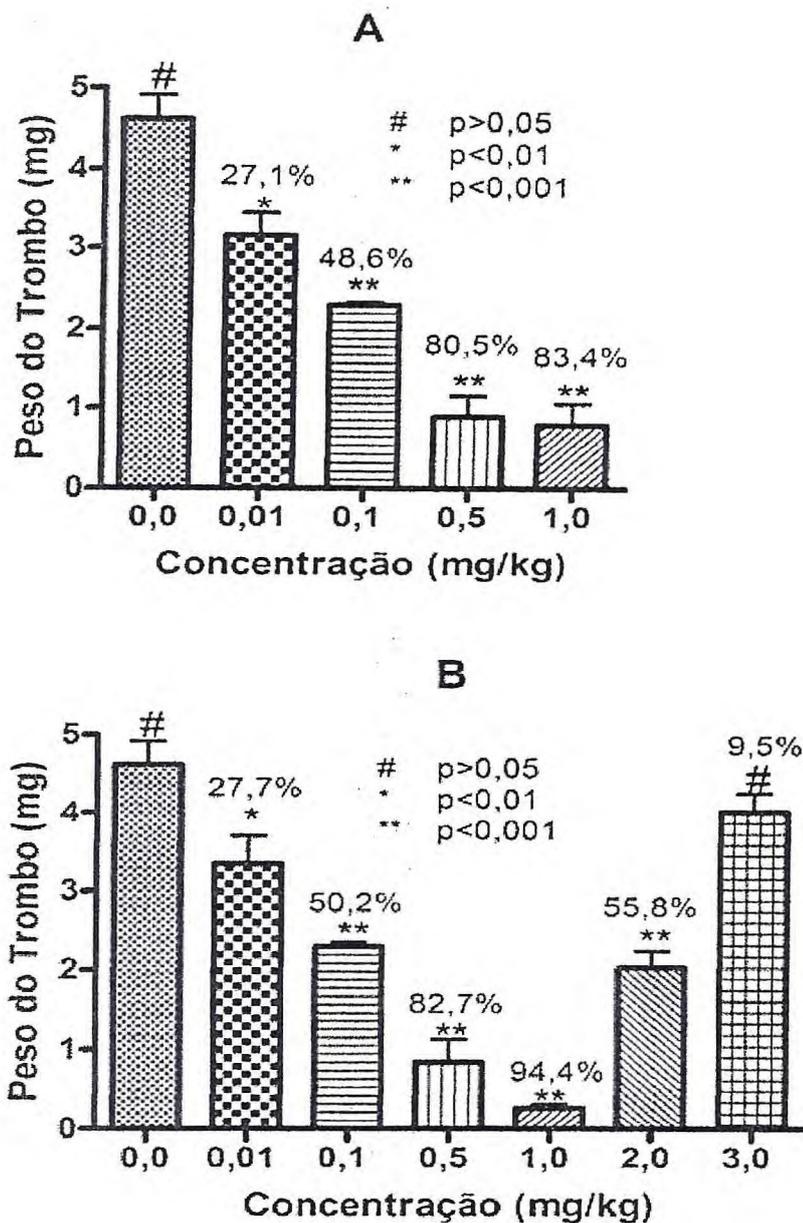


Figura 6 - Efeito da fração GaIV isolada da alga marinha vermelha *G. acerosa* coletada nas Praias de Flecheiras (A) e Paracuru (B) usando um modelo de estase de trombose na veia cava de ratos. Diferentes doses da fração dos dois locais foram administradas intravenosamente e comparadas ao grupo controle. A média do peso do trombo foi obtida através da média dos pesos de cada dose. A inibição foi apresentada em porcentagem, quando na presença e ausência da GaIV. Os valores dos trombos (média \pm D.P.M.) está expressa em função da concentração de polissacarídeo em mg.kg^{-1} .

Estudos relatam sobre a ocorrência de PS isolados de algumas espécies de algas marinhas com atividade anticoagulante *in vitro* e antitrombótica *in vivo* em ratos. Farias *et al.* (2000) e Pereira *et al.* (2005) observaram uma acentuada atividade anticoagulante da D-galactana sulfatada extraída da alga marinha vermelha *B. occidentalis*. A atividade foi

mediada pela inibição da trombina via antitrombina e cofator II da heparina (reguladores plasmáticos da coagulação sanguínea) pela presença de dois ésteres de sulfato em um único resíduo de galactose. Quando esse polissacarídeo foi utilizado em um modelo de trombose venosa em ratos, observou-se também que o composto exerce uma potente atividade antitrombótica *in vivo* 20 vezes superior a dose anticoagulante (FARIAS; NAZARETH; MOURÃO, 2001).

Fonseca *et al.* (2008), em continuidade aos estudos de Farias *et al.* (2000; 2001), reportaram um estudo comparativo entre duas galactanas sulfatadas isoladas das rodofíceas *B. occidentalis* e *G. crinale* envolvendo relações entre suas diferenças nas proporções e/ou distribuição dos radicais sulfato na estrutura química e seus mecanismos distintos de interação com proteases, inibidores e ativadores do sistema de coagulação. A finalidade do estudo foi elucidar as relações dos PS nas atividades anti- e pró-coagulantes, além das ações anti- e pró-trombóticas desses compostos. Especialmente a galactana isolada de *G. crinale*, que apresenta efeitos pró-coagulantes em baixas doses, os autores levaram a hipótese como uma ferramenta molecular promissora para pacientes acometidos por hemofilia e/ou outras doenças com deficiências de fatores de coagulação.

Quinderé (2008), avaliou a atividade antitrombótica de duas galactanas sulfatadas, presentes nas algas vermelhas *Acanthophora muscoides* e *Pterocladia capillacea*, que apresentaram inibição da trombose (81,52% e 65,65%) respectivamente para as algas citadas, nas doses de 0,5 mg.kg⁻¹.

Avaliando o PS da alga *B. occidentalis*, Melo e Mourão (2008b) relataram que seus efeitos antitrombóticos são decorrentes da sua potente atividade inibitória da trombina pela antitrombina e do fator Xa. Com relação ao efeito pró-trombótico, os autores sugeriram que o mecanismo de ação do PS é mediado pela ativação do fator XII, abolindo assim completamente sua ação antitrombótica. Para dissociar esses efeitos opostos do composto, a pesquisa se estendeu para diferentes preparações de derivados de PS tendo sido observado que o efeito antitrombótico, quando em altas doses, é abolido.

Portanto, nessa linha de raciocínio, é possível sugerir estudos posteriores utilizando o PS da alga *G. acerosa*, com diferentes preparações de pesos moleculares, em modelos de trombose venosa em ratos, embora se sabendo da natural propriedade gelificante das agaranas (KAMALESH-PRASAD *et al.* 2007), o que pode induzir, naturalmente, uma ação pró-trombótica, devido à viscosidade apresentada em concentrações mais elevadas deste composto.

Portanto, o estudo dessas moléculas isoladas de diferentes espécies produtoras de ficocolóide, como para a alga em questão (*G. acerosa*), poderia gerar perspectivas quanto à utilização de novos antitrombóticos ideais para o homem. Para uma melhor compreensão dos seus efeitos biológicos na ação antitrombótica, seria necessária a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na coagulação e a caracterização estrutural desse polissacarídeo. Neste sentido, pesquisas já estão sendo conduzidas pelo nosso grupo.

4. CONCLUSÕES

A alga marinha vermelha *G. acerosa*, coletada em dois bancos naturais de algas do Estado do Ceará (Flecheiras e Paracuru), apresentou atividade antitrombótica, quando a fração F IV foi avaliada em um modelo de trombose venosa em ratos utilizando diferentes concentrações. Acredita-se que através dos mecanismos de ação envolvidos na coagulação e a caracterização estrutural desse polissacarídeo será possível esclarecer tal fato.

Nenhuma das frações apresentou atividade anticoagulante *in vitro*, quando mensuradas pelo teste de TTPA.

A alga biossintetiza baixas concentrações de polissacarídeos sulfatados, quando obtidos por digestão proteolítica.

O procedimento de cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) foi eficiente na separação de diferentes frações polissacarídicas da espécie, revelando, por eletroforese, semelhantes características com relação à densidade de cargas negativas das moléculas isoladas. A composição química das frações polissacarídicas foi, no geral, diferente entre as frações obtidas, evidenciados por eletroforese. Parece que o ambiente de origem das algas não exerce um papel importante na biossíntese das características químicas moleculares.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, G. S.; FARIAS, W. R. L.; RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; PONTES, G. C. Administração oral dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Gracilaria caudata* na sobrevivência de pós-larvas de tilápia. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 04, p. 548-554, Out./Dez. de 2008.

ASSREUY, A. M. S.; GOMES, D. M.; DA SILVA, M. S. J.; TORRES, V. M.; SIQUEIRA, R. C. L.; PIRES, A. F.; CRIDDLE, D. N.; DE ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.4, p.691-695, Apr. 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, May 1976.

BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, function, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, Oxford v. 13, n. 6, p. 29R-40R, Feb. 2003.

CHOTIGEAT, W.; TONGSUPA, S.; SUPAMATAYA, K.; PHONGDARA, A. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, v.233, p.23-30, Apr. 2004.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, p. 645-647, Feb. 1976.

DIETRICH, C. P.; FARIAS, G. G. M.; ABREU, L. R. D.; LEITE, E. L.; SILVA, L. F.; NADER, H. B. A new approach for characterization of polysaccharides from algae: presence of four main acidic polysaccharides in three species of the Phaeophyceae. **Plant Science**, v.108, n.2, p.143-153, June 1995.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A Note on the Determination of the Ester Sulphate Content of Sulphated Polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, p. 106-110, July 1962.

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, p. 350-356, Mar. 1956.

ESTEVEZ, J. M., CIANCIA, M., CERESO, A. S. The system of galactans of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with emphasis on its minor constituents. **Carbohydrate Research**, v.339, p.2575-2592, Oct. 2004.

FARIAS, W. R. L.; NAZARETH, R. A.; MOURÃO, P. A. S. Dual effects of sulfated D-galactans from the red alga *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.86, n.6, p.1540-1546, Dec. 2001.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, Stanford, v.275, p.29299-29307, Sept. 2000.

FARNDAL, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 883, p. 173-177, Sept. 1986.

FONSECA, R. J. C., OLIVEIRA, S. N. M. C. G., MELO, F. R., PEREIRA, M. G., BENEVIDES, N. M. B., MOURÃO, P. A. S. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 99, p.539-545, Mar. 2008.

GANZON-FORTES, E. T., Characteristics of some Philippines agar. **Fisheries Annual**, v. 85, p. 62-65, 1985.

GANZON-FORTES, E. T. Influence of tidal location on morphology, photosynthesis and pigments of the agarophyte, *Gelidiella acerosa*, from Northern Philippines. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 525-532, 1997.

GELIDIELLA ACEROSA (Forsskål) Feldmann & G. Hamel. Disponível em:< http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=1865>. Acesso em: 30 de Jun. de 2009. 17h00min.

GREENWELL, H. C.; LAURENS, L. M. L.; JARVIS, R. M.; SHIELDS, R. J.; LOVITT, R. W.; FLYNN, K. J. Biocombustível: microalgas podem ser a solução?. **Revista Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 106, p. 40-45, 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. Guanabara Koogan, Ed. 10ª, 973 f., 2002.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; KOJIMA, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: In vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. **Aids Research and Human Retroviruses**, Larchmont, v.12, n.15, p.1463-1471, 1996.

HOLANDA, M. L. *Iota-carragenana da alga marinha vermelha Solieria filiformis versus iota-carragenana comercial: propriedades estruturais e reológicas*. 2007. Tese (Doutorado) – Departamento Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell wall of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanography Marine Biological Annual Review**, v.26, p.259-315, 1998.

KAMALESH PRASAD; SIDDHANTA, A. K.; GANESAN, M.; RAMAVAT, B. K.; JHA, B.; GHOSH, P. K.. Agars of *Gelidiella acerosa* of west and southeast coasts of India. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1907-1915, July 2007.

KAMALESH PRASAD; SIDDHANTA, A. K.; RAKSHIT, A. K.; AMIT BHATTACHARYA; GHOSH, P. K. On the properties of agar gel containing ionic and non-ionic surfactants, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, p. 135-144, 2005.

LEVI, M.; DÖRFFLER-MELLY, J.; JOHNSON, G. J.; DROUET, L.; BADIMON, L. Usefulness and limitation of animals models of venous thrombosis. Scientific and Standardization Comitee Communication. **International Society on Thrombosis and Haemostasis**, 2001.

LEVRING, T.; HOPPE, H.A.; SCHMID, O.J. *Marine Algae. A survey of research and utilization*. **Botanical Marine Handbook**, 1969. 421 f.

LINS, K.O.A.L.; BEZERRA, D.P.; ALVES, A.P.N.N.; ALENCAR, N.M.N.; LIMA, M.W.; TORRES, V.M.; FARIAS, W.R.L.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer) **Journal of Applied Toxicology**, n 29, p. 20-26, June 2009.

MACIEL, J. S.; CHAVES, L. S.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M. Structural characterization of cold extracted

fraction of soluble sulfated polysaccharides from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 04, p. 559-565, 2008.

MAJERUS, P. W.; TOLLEFESSEN, D. M. Anticoagulantes, trombolíticos e fármacos antiplaquetários. In: GOODMAN, A. G. (Ed). **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. Seção XI, cap. 55, p. 1122-1155, 2005.

MARINHO-SORIANO, E. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). **Journal of Biotechnology**, v. 89, n. 01, p. 81-84, July 2001.

MASUKO, T.; MINAMI, A.; IWASAKI, N.; MAJIMA, T.; NISHIMURA, S.; LEE, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, p. 69-72, 2005.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M. L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v.28, n.5, p.395-399, June 2001.

MELO, E. I.; PEREIRA, M. S.; CUNHA, R. S.; DE SÁ, M. P. L.; MOURÃO, P. A. S. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia cardiovascular. **Revista Brasileira de Clínica Cardiovascular**, v.23, n.2, p.169-174, 2008.

MELO, F. R.; PEREIRA, M. S.; MONTEIRO, R. Q.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P. A. S. Sulfated galactan is a catalyst of antithrombin-mediated inactivation of α -thrombin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1780, n.9, p.1047-1053, May 2008a.

MELO, F. R.; MOURÃO, P.A.S. An algal sulfated galactan has an unusual dual effect on venous thrombosis due to activation of factor XII and inhibition of the coagulation proteases. **Thrombosis and Haemostasis-Stuttgart**, v.99, n. 3, p. 531-538, 2008b.

MELO, M. R. S.; FEITOSA, J. P. A.; FREITAS, A. L. P.; DE PAULA, R. C. M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 491-498, 2002.

MOURÃO, A.P.S. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. **Current Pharmacological Design**, v.10, n.9, p.967-981, Apr. 2004.

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

NEORI, A.; KROM, M. D.; ELLNER, S. P.; BOYD, C. E.; POPPER, D.; RABINOVITCH, R.; DAVISON, P. J.; DVIR, O.; ZUBER, D.; UCKO, M.; ANGEL, D.; GORDIN, H. Seaweed biofilters as regulators of water quality in integrated fish – seaweed culture units. **Aquaculture**, Amsterdam, v.141, n.3-4, p. 183-199, May 1996.

OSLON, S. T.; BJÖRK, I. Regulation of thrombin by antithrombin and heparin cofactor II. In: **Thrombin structure and function**. (Berliner, L. J., ed.) Plenum Press, New York, p. 159-217, 1992.

PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. . In: **The Polysaccharides**, ASPINALL, G. O., Ed., 1st ed.; New York: Academic Press, v. 2, p 195-285, 1983.

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R.H. **Chemistry and enzymology of Marine Algal Polysaccharides**. New York: Academic Press, 1967.

PEREIRA, M. S. **Ação anticoagulante de galactanas sulfatadas: estrutura química versus atividade biológica**. 2002. 97f. Tese (Doutorado em Bioquímica) Departamento de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

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

PEREIRA, M. G. **Estrutura e atividades anticoagulante e antitrombótica de uma galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Gelidium crinale* (Turner) Gaillon**. 2005. 154 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

PREMAKUMARA, G. A. S; RATNASOORIYA, W. D.; TILLEKERATNE, L. M. V. Isolation of a Non-Steroidal Contraceptive Agent from Sri Lankan Marine Red Alga, *Gelidiella acerosa*. **Contraception**, v 54, n. 6, p. 379-383, Dec. 1996.

QUINDERÉ, A. L. G. **Atividades anticoagulante e antitrombótica dos polissacarídeos sulfatados das algas marinhas vermelhas *Acanthophora muscoides* (Rhodomelaceae) e *Pterocliadiella capillacea* (Gelidiaceae)**. 2008. 37f. Monografia (Graduação) – Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

RAMAVATAR MEENA; KAMALESH PRASAD; SIDDHANTA, A. K. Studies on “sugar-reactivity” of agars extracted from some Indian agarophytes. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 1206-1215, Dec. 2006.

RANG, H. P. DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6ª Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REVIERS, B. In: **Biologia e Filogenia das Algas** Natureza e posição das “algas” na árvore filogenética do mundo vivo, Editora Artmed, v. único, cap. 1 280 f. 2006.

ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. A Quebra de um Paradigma: Polissacarídeos de Macroalgas Marrons sem Atividade Anticoagulante “in vitro” Possuem Atividade Antitrombótica “in vivo”. In: Congresso Nacional de Botânica (59.: 2008: Natal, RN). **Anais do 59º Congresso Nacional de Botânica** Natal: Imagem Gráfica e Editora Ltda., p. 404-405, 2008.

ROCHA, H. A. O.; MORAES, F. A.; TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R. C.; TORQUATO, R. J. S.; VEIGA, S. S.; VALENTE, A. P.; MOURÃO, P. A. S.; LEITE, E. L.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Structural and Hemostatic Activities of a Sulfated Galactofucan from the Brown Alga *Spatoglossum schroederi* NA IDEAL ANTITHROMBOTIC AGENT? The **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 50, p. 41278-41288, Dec. 2005.

RODRIGUES, J. A. G.; JÚNIOR, J. S.; LOURENÇO, J. A.; LIMA, P. C. W. C.; FARIAS, W. R. L. Cultivo de camarões tratados com polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Halymenia pseudofloresia* mediante uma estratégia profilática. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.40, n.1, p.71-78, Jan./Mar. 2009a.

RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; DE 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 Agronômica**, Fortaleza, v.40, n.2, p.224-231, Abr./Jun. 2009b.

RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; BENEVIDES, N. M. B. Polissacarídeos sulfatados isolados 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

ROLEDA, M. Y.; GANZON-FORTES, E. T.; MONTAÑO, N. E.; DE LOS REYES, F. N. Temporal Variation in the Biomass, Quantity and Quality of Agar from *Gelidiella acerosa* (Forsskål) Feldmann *et* Hamel (Rhodophyta: Gelidiales) from Cape Bolinao, NW Philippines. **Botanica Marina**, v. 40, p. 487-495, 1997.

SILVEIRA, J. Risco de trombose cresce 26% a cada duas horas de vôo, diz estudo, **BRASIL ATUAL Online**, 15 DE July 2009. Disponível em: <<http://brasilatual.com.br/sistema/?p=2657>>. Acesso em: 2 de Maio de 2010.

SZE, P. **A biology to the algae**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 278 p, 1997.

TALARICO, L. B.; PUJOL, C. A.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; NOSEDA, M. E. R.; DAMONTE, E. B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**, Amsterdam, v.66, n.2-3, p.103-110, June 2005.

THOMAS, D. P. Does low molecular weight heparin cause less bleeding?. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v.78, n.6, p.1422-1425, 1997.

USOV, A. I. NMR Spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carragenanas and xylans. **Botanica Marina**. v.27, p. 189-202, Jan. 1984.

VOGEL, G. M. T., MEULEMAN, D. G., BOURGONDIEN, F. G. M., HOBBELEN, P. M. J. Comparison of two experimental thrombosis models in rats effects of four glycosaminoglycans. **Thrombosis Research**, v. 54, p.399-410, June 1989.

WANG, Y. F; ZHANG, L. N; LI, Y. Q; HOU, X. H; ZENG, F .B. Correlation of structure to antitumor activities of five derivates of a β -glucan from *Poria cocos sclerotium*. **Carbohydrate Research**, Oxford, v.339, n.15,p.2567-2574, Oct. 2004.

ZHOU, G.; SUN, Y. P; XIN, H.; ZHANG, Y. N; LI, Z.; XU, Z. H. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, London, v.50, n.1, p.47-53, July 2004.