



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FRANCISCO DIÊGO DA SILVA CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA
VERMELHA *Gelidiella acerosa*

FORTALEZA
2018

FRANCISCO DIÊGO DA SILVA CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA
VERMELHA *Gelidiella acerosa*

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

FORTALEZA

2018

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)

C424c Chagas, Francisco Diêgo da Silva.

Caracterização estrutural e propriedades bioativas dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa* / Francisco Diêgo da Silva Chagas. – 2018.

86 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Ana Lucia Ponte Freitas .

1. *Gelidiella acerosa*. 2. Agarana. 3. Estrutura química. 4. Antitrombótico. 5. Antioxidante.

I. Título.

CDD 572

FRANCISCO DIÉGO DA SILVA CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA MARINHA
VERMELHA *Gelidiella acerosa*

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: 16 / 02 / 2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas (orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Daniel Ferreira Feijó
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a **Ana Lúcia Ponte Freitas**, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela disponibilidade e compromisso. Por todo o carinho que sempre demonstrou. Você torna o ambiente de trabalho um espaço de bondade, deixando sempre a rotina no laboratório mais leve e prazerosa. O seu espírito alegre de orientadora irei levar para o resto da vida.

À Prof.^a **Eliane Marinho Soriano**, pela disponibilidade de colaboração e identificação da espécie de alga marinha utilizada nesse estudo.

Aos membros da banca, **Daniele Sousa** e **Daniel Feijó**, por todas as contribuições e pela disponibilidade em participar da minha banca de defesa de mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Algas Marinhas, **Agnes Vitória, Clark Barros, Glauber Lima, João Bosco, Lindauro Pereira, Luís Costa, Poliana Cavalcante, Thaís Costa, Willer Malta, Valesca Nobre** e **Vanessa Ferreira** pela ajuda na pesquisa e todos os momentos de companheirismo. Com vocês o trabalho foi bem mais leve e divertido.

Ao Laboratório de Polímeros da UFC, em especial, a Professora **Regina de Paula** e ao **Venicius Sombra**, pelo auxílio na realização da caracterização química.

Ao laboratório de Fisiofarmacologia da Inflamação da UECE, em especial, a professora **Maria Gonçalves** e ao **Diego Freitas** e **Alana Queiroz**, pelo auxílio na realização dos experimentos de coagulação sanguínea e trombose.

Ao meu querido amigo, **Jeferson Saldanha**, pelo carinho e por sempre ter acreditado em mim, além disso me encorajou em todos os momentos. Nunca me deixou desistir, por isso te devo enormes agradecimentos por fazer parte da minha vida e de minhas conquistas.

À minha amiga, **Cinthia Queiroz**, por todos os momentos de descontração. Você é uma pessoa incrível e que deixa tudo mais leve.

Ao meu amigo, **André Roque**, pela ajuda nos momentos de aflição com sua calma e sabedoria. Ele é o irmão que me faltava em Fortaleza.

À minha amiga, **Cristiane Nogueira**, por tornar a jornada mais fácil, pois era com você que compartilhava os momentos de estudo, trabalho e também de diversão. Tivemos uma grande jornada juntos, desde a graduação até hoje na pós-graduação.

À minha mãe, **Iracir Braz**, por ter sido tão amorosa e companheira durante toda a minha vida, estando sempre ao meu lado. Eu devo a ela todas as minhas conquistas, pois sem sua determinação e garra eu não estaria aqui.

Aos meus queridos irmãos, **Jorge Braz** e **Junior Chagas**, vocês são maravilhosos e sempre me deram força para seguir em frente.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

*“Se eu vi mais longe, foi por estar em pé
sobre os ombros dos gigantes”.*

Isaac Newton

RESUMO

As algas marinhas vermelhas são fontes naturais de vários compostos bioativos, destacando-se os carboidratos. Dentre esses polímeros, os polissacarídeos sulfatados são moléculas complexas que têm despertado grande interesse na área biomédica. Diante disso, o estudo objetivou isolar os polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa* (PSGa) e verificar seu potencial bioativo como agente anticoagulante, antitrombótico, antiplaquetário e antioxidante. Os PSGa apresentam uma massa molar média de 284,8 kDa e conteúdo de carboidratos de 89,5%. Além disso, a microanálise mostrou níveis de carbono (32%), hidrogênio (5,4%), enxofre (4,5%). A caracterização química dos PSGa foi realizada através de análises por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), identificando os PSGa como uma galactana sulfatada do tipo agarana. A atividade anticoagulante foi investigada pelos testes clássicos de TTPA e TP e a atividade antitrombótica e tendência hemorrágica foram avaliadas pelo modelo de trombose venosa e teste de tempo de sangramento, respectivamente. O potencial antioxidante foi avaliado através dos seguintes testes: capacidade antioxidante total, habilidade de quelação do íon ferroso, capacidade de sequestro do radical DPPH e atividade de eliminação do radical hidroxila. Os PSGa foram capazes de prolongar o tempo de coagulação no teste TTPA e inibiram a agregação plaquetária. Além disso, apresentaram um efeito antitrombótico significativo, sem distúrbios hemorrágicos, dose-dependente de 40%, 64% e 80% a 0,1, 0,5 e 1 mg/kg, respectivamente. Os polissacarídeos sulfatados apresentaram considerável atividade antioxidante em todos os testes realizados com resultados de 41,7%, 66,6%, 70,6% e 98,2% no sequestro do radical DPPH, sobre a quelação de íons de ferro, na eliminação do radical hidroxila e na capacidade antioxidante total, respectivamente. Os resultados sugerem os polissacarídeos sulfatados de *G. acerosa* como agentes naturais alternativos com atividade antitrombótica e antioxidante promissoras.

Palavras-chave: *Gelidiella acerosa*. Agarana. Estrutura química. Antitrombótico. Antioxidante.

ABSTRACT

Red seaweeds are a natural source of several bioactive compounds, especially carbohydrates. Among these polymers, the sulfated polysaccharides are complex molecules that have aroused great interest in the biomedical field. Therefore, the study aimed to isolate the sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gelidiella acerosa* (GaSP) and to verify its bioactive potential as anticoagulant, antithrombotic, antiplatelet and antioxidant agent. The GaSP have a mean molar mass of 284.8 kDa and carbohydrate content of 89.5%. In addition, the microanalysis showed levels of carbon (32%), hydrogen (5.4%), sulfur (4.5%). The chemical characterization of GaSP was performed through Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analyzes, identifying the GaSP as a sulfated galactan of the agaran type. The anticoagulant activity was investigated by the classical tests of APTT and PT and the antithrombotic activity and hemorrhagic tendency were evaluated by the venous thrombosis model and bleeding time test, respectively. The antioxidant potential was evaluated through the following tests: total antioxidant capacity, ferrous ion chelation ability, capacity of scavenging DPPH radical and hydroxyl radical elimination activity. the GaSP were able to prolong the coagulation time in the APTT test and inhibited platelet aggregation. In addition, they had a significant dose-dependent antithrombotic effect, without hemorrhagic disturbs, of 40%, 64% and 80% at 0.1, 0.5 and 1 mg/kg, respectively. The sulfated polysaccharides presented high antioxidant activity in all tests performed with results of 41.7%, 66.6%, 70.6% and 98.2% against the radical DPPH, on the chelation of iron ions, on the elimination of the hydroxyl radical and on the total antioxidant capacity, respectively. The results suggest the sulfated polysaccharides of *G. acerosa* as alternative natural agents with promising antithrombotic and antioxidant activity.

Keywords: *Gelidiella acerosa*. Agaran. Chemical structure. Antithrombotic. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Representação da espécie <i>Gelidiella acerosa</i> e sua classificação.....	19
Figura 2	- Representação estrutural das galactanas de algas vermelhas.....	21
Figura 3	- Estrutura química da agarana.....	22
Figura 4	- Representação esquemática da via extrínseca do sistema de coagulação sanguínea.....	27
Figura 5	- Representação esquemática da via intrínseca do sistema de coagulação sanguínea.....	28
Figura 6	- Representação da via comum do sistema de coagulação sanguínea.....	29
Figura 7	- Os principais eventos plaquetários que ocorrem durante o processo de hemostasia.....	30
Figura 8	- Representação esquemática do estresse oxidativo.....	32
Figura 9	- Esquema de extração enzimática dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i>	39
Figura 10	- Esquema de quantificação do conteúdo de carboidratos.....	40
Figura 11	- Esquema de quantificação do conteúdo de proteínas contaminantes.....	41
Figura 12	- Perfil cromatográfico de permeação em gel dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i>	51
Figura 13	- Espectro de absorção na região do infravermelho dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i>	52
Figura 14	- Espectro de RMN de ¹ H dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i>	55
Figura 15	- Espectro de RMN de ¹³ C dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i>	56
Figura 16	- Espectro de HSQC dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i>	57

Figura 17 - Efeito dos polissacarídeos de <i>Gelidiella acerosa</i> sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.....	61
Figura 18 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i> sobre a trombose venosa induzida por tromboplastina.....	63
Figura 19 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i> sobre o tempo de sangramento por transecção da cauda.....	64
Figura 20 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i> sobre o teste de capacidade antioxidante total.....	65
Figura 21 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i> sobre o teste de quelação do íon ferroso.....	67
Figura 22 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i> sobre o teste de sequestro do radical DPPH.....	68
Figura 23 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i> sobre o teste de eliminação do radical hidroxila.....	70

LISTA DE TABELAS

	Análises químicas dos polissacarídeos sulfatados obtidos de	
Tabela 1	- <i>Gelidiella acerosa</i>	50
	Atribuições no espectro do infravermelho para grupamentos de	
Tabela 2	- polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.....	53
	Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para os polissacarídeos	
Tabela 3	- sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i>	58
	Atividade anticoagulante dos polissacarídeos de <i>Gelidiella</i>	
Tabela 4	- <i>acerosa</i> avaliada pelo teste de TTPA.....	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido Ascórbico
ADP	Adenosina Difosfato
ANDG	Ácido Nordihidroguaiarético
BHT	Hidroxitolueno Butilado
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAPM	Cininogênio de Alto Peso Molecular
CPC	Cloreto de Cetil Piridínio
DS	Grau de Sulfatação
DSS	2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de Sódio
DCVs	Doenças Cardiovasculares
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila-hidrato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetra-acético
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
FT	Fator Tissular
GP	Galato de Propileno
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
KBr	Pastilhas de Brometo de Potássio
MPK	Pico das Massas Molares
NO	Óxido Nítrico
PBS	Tampão Fosfato Salino

PPP	Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
PSGa	Polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TXA ₂	Tromboxano A2
TP	Tempo de Protrombina
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada
UV	Ultra Violeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Algas.....	16
1.2	Gênero <i>Gelidiella</i>	17
1.3	Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.....	18
1.3.1	<i>Galactanas sulfatadas</i>	19
1.3.1.1	<i>Agaranas</i>	20
1.4	Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados.....	22
1.5	Hemostasia e coagulação sanguínea.....	24
1.6	Agregação plaquetária.....	28
1.7	Trombose.....	30
1.8	Estresse oxidativo.....	31
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo geral.....	34
2.2	Objetivos específicos.....	34
3	MATERIAIS	35
3.1	Alga marinha.....	35
3.2	Animais.....	35
3.3	Plasma.....	35
3.4	Aspectos éticos e legais.....	36
3.5	Drogas e reagentes.....	36
4	MÉTODOS	37
4.1	Extração dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i>	37
4.2	Análises químicas e estruturais dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i>	38
4.2.1	<i>Quantificação do conteúdo de carboidratos</i>	38
4.2.2	<i>Quantificação do conteúdo de proteínas contaminantes</i>	39
4.2.3	<i>Quantificação do conteúdo de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre</i>	40
4.2.4	<i>Determinação da massa molar média por cromatografia de permeação em gel</i>	41

4.2.5	<i>Caracterização química por espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....</i>	41
4.2.6	<i>Determinação da estrutura química por ressonância magnética nuclear.....</i>	41
4.3	Atividade anticoagulante e antiagregante plaquetária <i>in vitro</i> ...	42
4.3.1	<i>Tempo de tromboplastina parcialmente ativada</i>	42
4.3.2	<i>Tempo de Protrombina.....</i>	42
4.3.3	<i>Agregação plaquetária</i>	43
4.4	Atividade anticoagulante e antitrombótica <i>in vivo</i>	43
4.4.1	<i>Trombose venosa.....</i>	43
4.4.2	<i>Tendência hemorrágica.....</i>	44
4.5	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	44
4.5.1	<i>Capacidade antioxidante total.....</i>	44
4.5.2	<i>Quelação do íon ferroso.....</i>	44
4.5.3	<i>Sequestro do radical DPPH.....</i>	45
4.5.4	<i>Eliminação do radical hidroxila.....</i>	45
4.6	Análise estatística.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	Extração e rendimento dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i>	47
5.2	Análises químicas e estruturais dos polissacarídeos sulfatados de <i>Gelidiella acerosa</i>	47
5.2.1	<i>Quantificação do conteúdo de carboidratos.....</i>	48
5.2.2	<i>Quantificação do conteúdo de proteínas contaminantes.....</i>	48
5.2.3	<i>Quantificação do conteúdo carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre.....</i>	48
5.2.4	<i>Determinação da massa molar por cromatografia de permeação em gel.....</i>	49
5.2.5	<i>Caracterização química por espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....</i>	51
5.2.6	<i>Determinação da estrutura química por ressonância magnética nuclear.....</i>	53
5.3	Atividade anticoagulante e antiagregante plaquetária <i>in vitro</i> ...	57

5.3.1	<i>Tempo de tromboplastina parcialmente ativada</i>	57
5.3.2	<i>Tempo de Protrombina</i>	59
5.3.3	<i>Agregação plaquetaria</i>	59
5.4	<i>Atividade anticoagulante e antitrombótica in vivo</i>	61
5.4.1	<i>Trombose venosa</i>	61
5.4.2	<i>Tendência hemorrágica</i>	62
5.5	<i>Atividade antioxidante in vitro</i>	64
5.5.1	<i>Capacidade antioxidante total</i>	64
5.5.2	<i>Quelação do íon ferroso</i>	65
5.5.3	<i>Sequestro do radical DPPH</i>	67
5.5.4	<i>Eliminação do radical hidroxila</i>	68
6	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas

As algas são organismos pertencentes ao reino protista e desempenham grande importância ecológica, ocupando uma posição basal na cadeia alimentar de lagos e oceanos, podendo também ocupar ambientes terrestres ou viver em associação com outros organismos, como os líquens. São classificados como eucariotos, autotróficos e podem ser unicelulares ou pluricelulares e são fundamentais para manutenção do equilíbrio ecológico nos ambientes em que se encontram (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014). Além disso, apresentam uma vasta aplicação na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As algas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho, em microalgas e macroalgas, compreendendo as algas microscópicas e macroscópicas, respectivamente. As macroalgas podem ser classificadas de acordo com características bioquímicas estruturais, aspectos citológicos e morfológicos, compondo três grupos principais: Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas pardas) e Chlorophyta (algas verdes) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

Em estudos realizados nas últimas décadas, com o surgimento de técnicas mais avançadas de biologia molecular, as concepções sobre a taxonomia das algas vêm sofrendo algumas alterações. Com base nessas novas descobertas, em especial na interpretação da sequência de base de DNA do cloroplasto e de sequências de RNA ribossomal, as algas são classificadas atualmente em Cyanophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Cryptophyta, Phaeophyta, Dinophyta, Haptophyta, Euglenophyta, Chlorophyta e Charophyta (PEREIRA; NETO, 2014).

Dentre os grupos de algas marinhas o filo Rhodophyta apresenta entre 4.000 a 6.000 espécies. As algas vermelhas compõem o grupo de maior importância econômica mundial e preeminência na costa brasileira, apresentando grande diversidade no território nacional (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). As algas do gênero Rhodophyta são quase que exclusivamente macroscópicas e marinhas e ocorrem predominantemente em mares quentes. Estes organismos apresentam uma grande diversidade de tamanhos, variando de poucos centímetros até cerca de 1 m de comprimento. Estes protistas são predominantemente multicelulares, filamentosas e

pseudoparenquimatosas, podendo ser encontradas nas formas compridas, cilíndricas ou foliáceas (MCHUGH, 2003; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014; TEIXEIRA, 2012).

As algas vermelhas apresentam a coloração vermelha violacea devido a presença do pigmento fotossintético acessório presente nos cloroplastos, a ficoeritrina. Os pigmentos ficocianina e aloficocianina também estão presentes e encontram-se em menor quantidade. Além disso, apresentam em sua constituição as clorofilas “a” e “d” (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014).

Em relação a composição química da parede celular das algas vermelhas, essas são formadas por grandes quantidades de polissacarídeos, principalmente celulose, além de outras macromoléculas como glicoproteínas e galactanas. A parede celular possui regiões fibrilares e rígidas, embebidas em uma matriz amorfa, garantindo resistência a célula (FLORES *et al.*, 1997; LECHAT *et al.*, 2000; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014). Além da presença da matriz amorfa, uma considerável parcela da parede celular é formada pela matriz mucilaginosa que é composta por galactanas sulfatadas, agaranas e/ou carragenanas, que estão intimamente relacionadas as funções de regulação osmótica e iônica (KLOAREG; QUATRANO, 1988). Além disso, as galactanas estão envolvidas com o mecanismo de defesa para as algas em respostas ambientais (ANDRADE *et al.*, 2010).

O foco sobre as algas marinhas é devido ao fato delas apresentarem vários compostos bioativos como proteínas, carotenóides, polifenóis e carboidratos (KUSAYKIN *et al.*, 2008; WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011). Dentre essas moléculas, os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas são macromoléculas complexas, que apresentam vários efeitos fisiológicos positivos descritos na literatura (BRITO *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2013; CUMASHI *et al.*, 2007; QUINDERÉ *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2011 e SUDHARSAN *et al.*, 2015).

1.2 Gênero *Gelidiella*

O gênero *Gelidiella* pertence a uma família com dois gêneros denominada *Gelidiellaceae*. A principal característica distintiva desta família é a ausência de rizines espessos filamentos de fibras presentes no córtex ou na região medular das macroalgas (PRASAD *et al.*, 2007; LIN; FRESHWATER, 2008).

Gelidiella acerosa (Rhodophyta, Rhodymeniophycidae, Gelidiales, Gelidiellaceae), é uma alga marinha de coloração vermelha vináceo podendo ocorrer

também nas tonalidades amarronzadas ou esverdeadas (Figura 1). A espécie possui larga distribuição em vários países tropicais ocorrendo nas zonas entremarés e em geral forma tapetes de algas mesclados com outras espécies. Uma das principais características morfológicas em relação a outras espécies são os esporângios divididos tetraedricamente. Essa característica é frequente devido ao fato da baixa ocorrência de exemplares em fase gametofítica (PRASAD *et al.*, 2007; LIN; FRESHWATER, 2008).

Figura 1 – Representação da espécie *Gelidiella acerosa* e sua classificação.

Fonte: AlgaeBASE (2017).



A importância econômica do gênero *Gelidiella* deve-se principalmente a alta qualidade do seu ágar, apresentando altos valores de força de formação de gel. Diante dessas características, o ágar das espécies pertencentes a esse gênero, apresenta uma ampla possibilidade de utilização na área bacteriológica (GANESAN *et al.*, 2008).

1.3 Polissacarídeos Sulfatados de Algas Marinhas

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na face da terra. São polímeros que exercem tanto funções estruturais quanto de proteção nas paredes celulares das algas marinhas. Os carboidratos são divididos em três classes, de acordo com o tamanho de sua molécula: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, possuindo uma variação progressiva de tamanho de cadeia. Os polímeros que contêm mais de 20 unidades são chamados de polissacarídeos, que

podem ter cadeias contendo centenas ou milhares de unidades monossacarídicas (NELSON; COX, 2014).

Os polissacarídeos sulfatados não são moléculas exclusivas das macroalgas marinhas, podendo também ser encontrados em microalgas (RAPOSO *et al.*, 2013), invertebrados (MOURÃO *et al.*, 1996) e gramíneas marinhas, como relatado por Aquino *et al.* (2005). Nas macroalgas marinhas, os polissacarídeos sulfatados podem estar na forma de galactanas sulfatadas nas algas vermelhas (Rhodophyta), de fucanas nas algas marrons (Phaeophyta) e, nas verdes, os mais encontrados são as arabino-galactanas (Chlorophyta) (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967). Os polissacarídeos sulfatados são macromoléculas polianiônicas complexas e heterogêneas, formadas por várias unidades repetidas de açúcares e carregadas negativamente devido à presença de grupamentos sulfatos ou carboxilas de ácidos urônicos, estando presente principalmente em algas marinhas (JIAO *et al.*, 2011).

Os polissacarídeos sulfatados estão presentes na matriz extracelular das algas, no entanto, pouco se sabe sobre suas funções. Alguns autores sugerem que sua principal função seja proteção contra a desidratação que ocorre em condições de maré baixa, explicando o maior teor de polissacarídeos sulfatados em algas que se encontram na zona entremarés (MICHEL *et al.*, 2010).

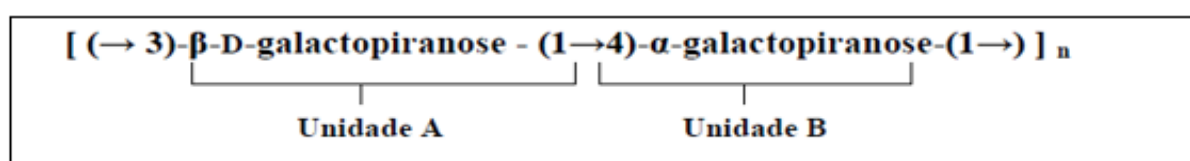
As galactanas são constituídas principalmente por repetições do monossacarídeo galactose. Além disso, podem ocorrer variações estruturais consideráveis nas galactanas sulfatadas obtidas de mesmas espécies de algas marinhas vermelhas, caso os espécimes tenham sido coletados em ambientes distintos ou em diferentes estações do ano (CRAIGIE, 1990).

1.3.1 Galactanas Sulfatadas

As galactanas são polissacarídeos com grande variação estrutural, cuja distribuição do sulfato ao longo da cadeia de galactose é totalmente heterogênea e os teores de sulfato são variados entre as espécies, interferindo dessa forma na resposta biológica dessas moléculas. Essa diversidade de efeitos fisiológicos está intimamente ligada as mudanças em termos de padrões de sulfatação, substituições da cadeia lateral e a ocorrência de éteres metílicos ou açúcares anidros (PEREIRA *et al.*, 2005; QUINDERÉ *et al.*, 2014).

Em relação a sua composição, as galactanas possuem uma estrutura dissacarídica característica, cuja unidade A é composta por β (1 \rightarrow 3) D-galactopiranosose e a unidade B é uma α (1 \rightarrow 4) D- ou L- galactopiranosose, apresentando grupamentos sulfatos ao longo de sua estrutura (Figura 2). Ademais, algumas unidades de α - galactopiranosose podem ocorrer também na forma cíclica 3,6-anidrogallactopiranosose (STORTZ; CASES; CERREZO, 1997)

Figura 2 – Esquema representativo estrutural de galactanas sulfatadas de algas vermelhas.



Fonte: Sousa (2015).

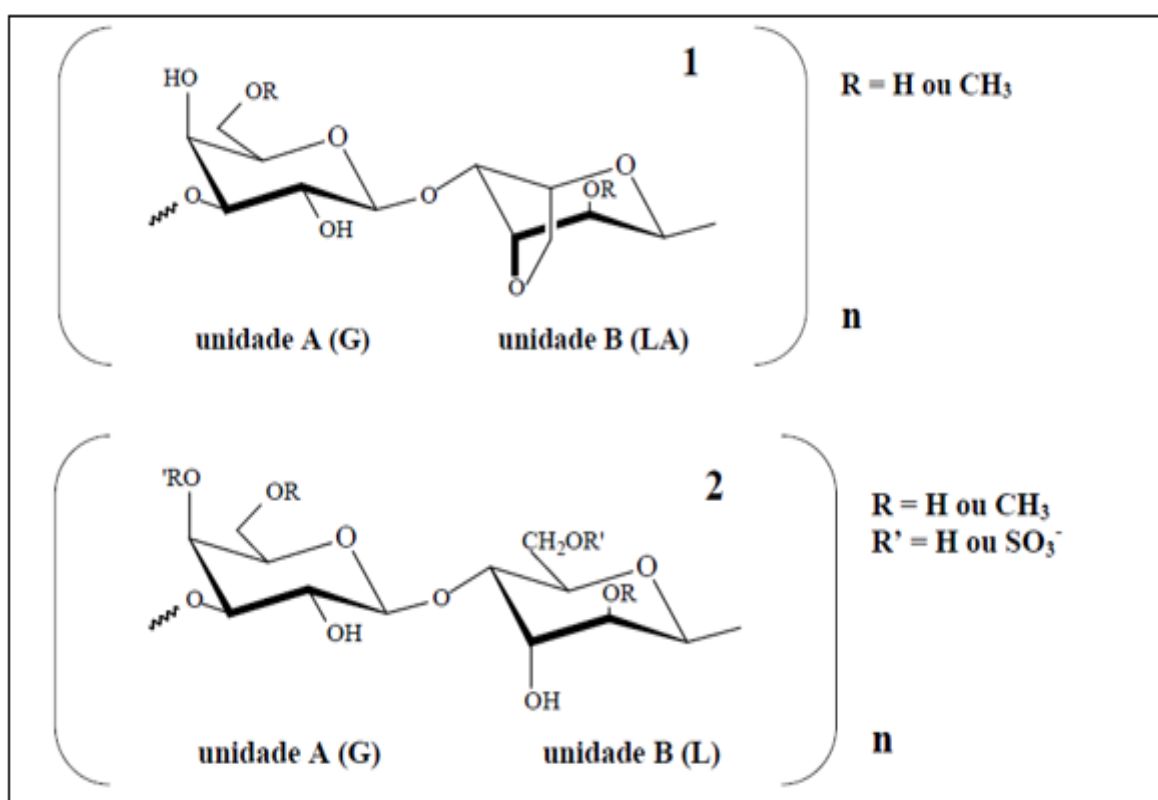
Quanto a caracterização estrutural, as galactanas sulfatadas podem existir na natureza como agaranas ou carragenanas (VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). As galactanas sulfatadas sempre apresentam na sua constituição química, a unidade A na configuração enantiomérica D-, enquanto que a unidade B pode se apresentar tanto na configuração enantiomérica D- como na L-. Quando a unidade B pertencer à série D-, a galactana é classificada como carragenana e quando pertencer à série L-, é classificada como agarana (STORTZ; CASES; CERREZO, 1997). Segundo Stortz e Cerezo (2002) estudos mostraram a presença de um terceiro grupo de galactanas que foi chamado de híbrido, pois, esse grupo apresenta na unidade B ambas as formas enantioméricas D- e L-.

1.3.1.1 Agaranas

A matriz interna da parede celular das algas vermelhas da família *Gelidiellaceae*, contém ágar como o polissacárido mais abundante da parede celular (ARMISEN; GALATAS, 1987). O ágar ou agarana, é um biopolímero gelatinoso devido as suas excelentes propriedades reológicas, tem sido comercialmente explorado em vários ramos industriais, como: alimentício, cosmético, biotecnológico, farmacêutico e biomédico (LEE, *et al.* 2017).

O termo ágar é usado para descrever uma gama de polissacarídeos com propriedades gelificantes constituídos de enantiômeros D- e L- de galactose. As agaranas consistem da mistura de uma fração neutra, chamada de agarose e de uma fração aniônica, que corresponde às agarpectinas (Figura 3) (LI *et al.*, 2008; MUTHUSWAMY *et al.*, 2007).

Figura 3 - Estrutura química da agarana: agarose (1) e agarpectina (2).



Fonte: Barros *et al.* (2013).

A fração neutra, composta por agarose, corresponde a uma estrutura molecular linear, que não apresenta grupamento sulfato na sua composição química. Essas moléculas são formadas por unidades alternadas β -1,3 D-galactose e α -1,4 3,6-anidro-L-galactose. Esse polímero pode apresentar substituições de seus resíduos de monossacarídeos por 6-O-metil-D-galactose, L-galactose e 2-O-metil-L-galactose (ARMISEN; GALACTAS, 1987; PHILLIPS; WILLIAMS, 2009).

A porção ácida, formada pela agarpectina, contém vários grupamentos, como: sulfato, metil, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico, que estão associados a uma estrutura linear da agarose, localizados em diferentes combinações ou posições na

molécula, garantindo assim a grande variedade estrutural dos polissacarídeos de algas marinhas vermelhas (ARMISEN; GALACTAS, 1987).

1.4 Atividades Biológicas de Polissacarídeos Sulfatados

A utilização da biomassa oriunda das algas marinhas é baseada principalmente nas propriedades específicas dos polissacarídeos (LAHAYE; ROBIC, 2007). Os polissacarídeos sulfatados são moléculas promissoras na área da ciência, devido a sua composição química complexa. Diante disso, essas macromoléculas apresentam diferentes possibilidades de ligações a proteínas em solução a nível de matriz celular ou até mesmo no plasma sanguíneo, promovendo e potencializando várias respostas biológicas (ARFORS; LEY, 1993).

Vários estudos têm sido realizados envolvendo polissacarídeos sulfatados obtidos de diferentes fontes, como: vertebrados (KJELLÉN; LINDAHL, 1991), invertebrados (MOURÃO; PEREIRA, 2000), gramíneas marinhas (AQUINO *et al.*, 2005), microalgas (ARAD; LEVY-ONTMAN, 2010) e algas marinhas (MOHAMED; HASHIM; RAHMAN., 2012; NGO; KIM, 2013; WIJESINGHE; JEON, 2012). Nas algas marinhas, os polissacarídeos sulfatados são moléculas abundantes e têm demonstrado uma gama de efeitos fisiológicos desejáveis (WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011). Como observado para galactanas da alga marinha vermelha *Spyridia hypnoides* que apresentaram efeito antioxidante e anticoagulante (SUDHARSAN, *et al.*, 2018).

Os polissacarídeos de algas marinhas vermelhas possuem uma larga aplicação na indústria alimentícia, resultando na publicação de diversos trabalhos. Vários desses estudos são referentes a aplicação desses polissacarídeos como hidrocolóides com considerável capacidade de formar géis com potencial antioxidante, visando aplicação biotecnológica na indústria alimentícia (SEEDEVI *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2012).

Polissacarídeos caracterizados como carragenana isolados da alga vermelha *Amansia multifida*, mostraram-se moléculas promissoras apresentando uma gama de efeitos biológicos, agindo sobre a inflamação, angiogênese e coagulação, sem apresentar toxicidade celular (DE SOUZA *et al.*, 2012). Já os polissacarídeos da alga vermelha *Gracilaria corticata*, caracterizados como agaranas, apresentaram fortes efeitos antioxidante e antibacteriano (SEEDEVI *et al.*, 2017).

De modo geral, as agaranas possuem várias atividades biológicas descritas na literatura, dentre as quais podem ser destacadas os efeitos dessas moléculas em diferentes processos fisiológicos, atuando como: anti-inflamatório (CHAVES *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2014), antinociceptivo (ARAUJO *et al.*, 2017; COURA *et al.*, 2012), gastroprotetor (BRITO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2012), antidiarreico (LEÓDIDO *et al.*, 2017), anticoagulante (SEEDEVI *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2005), antitrombótico (QUINDERÉ *et al.*, 2014) e antioxidante (FIDELIS *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2012). Apesar dos crescentes estudos sobre o potencial biológico de galactanas isoladas de algas marinhas, são necessárias novas investigações acerca do potencial farmacológico dessas moléculas obtidas de diferentes espécies do nordeste brasileiro, que ainda não tiveram seu potencial bioativo investigado e nem sua estrutura desvendada.

A busca de compostos com potencial antioxidante tem recebido bastante atenção nas últimas décadas, uma vez que, o estresse oxidativo está intimamente relacionado a gênese e perpetuação de diversas patologias (PASSALI *et al.*, 2015). Inclusive o estresse oxidativo na parede vascular e no miocárdio é uma marca registrada para o desenvolvimento de doenças que afetam o sistema de coagulação, como hipercolesterolemia, hipertensão, diabetes, aterosclerose e hipertrofia cardíaca, pois a homeostase cardiovascular só é alcançada em condições de equilíbrio entre a geração de compostos anticoagulantes como o óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs), já que esses radicais livres limitam os efeitos desse anticoagulante endógeno (RITCHIE *et al.*, 2017).

Além disso, a busca por drogas com potencial anticoagulante e antitrombótica recebem um grande foco devido a busca por compostos que não apresentem as desvantagens ocasionadas pelo uso da heparina e seus derivados (MOURÃO; PEREIRA, 2000; QUINDERÉ *et al.*, 2014; POMIN, 2016). Diante disso, os polissacarídeos de algas marinhas são moléculas promissoras, já que não são tóxicos, apresentam alta disponibilidade na natureza e são de fácil obtenção, possibilitando a busca de um composto com potencial anticoagulante e antitrombótico, pois são moléculas sulfatadas e com semelhança estrutural com a heparina, além disso, possuem vários relatos do seu potencial sobre a coagulação sanguínea na literatura (MOURÃO; PEREIRA, 2000; QUINDERÉ *et al.*, 2014).

1.5 Hemostasia e Coagulação Sanguínea

A hemostasia é uma resposta fisiológica que envolve a coagulação do sangue e sua interrupção, sendo um passo necessário para evitar o sangramento excessivo ou a formação de trombos, mantendo o fluxo sanguíneo normal (HA; BHAGAVAN, 2011). Esse processo é acionado através do espasmo vascular (vasoconstrição), formação do tampão plaquetário, formação do coágulo sanguíneo e a sua posterior dissolução. Nestas etapas, ocorrem interações entre componentes teciduais, proteínas plasmáticas e receptores celulares (DE REVEL; DOGHMI, 2004; HA; BHAGAVAN, 2011).

A vasoconstrição é a resposta inicial em casos de injúria que induz a sístole do músculo liso (HA; BHAGAVAN, 2011). Esse passo culmina na redução do fluxo sanguíneo, diminuindo a perda de sangue resultante da injúria. Apesar de prevenir hemorragias a constrição vascular não consegue cessar o sangramento. Para isso é necessária a formação do tampão plaquetário e coágulo sanguíneo (DE REVEL; DOGHMI, 2004).

A formação do tampão plaquetário é seguida do processo de vasoconstrição e exposição das proteínas sanguíneas ao colágeno das paredes do vaso (HA; BHAGAVAN, 2011). O tampão plaquetário é uma barreira frágil, temporária e incapaz de sustentar o extravasamento sanguíneo, necessitando recorrer ao mecanismo da hemostasia secundária, através da coagulação sanguínea, que se caracteriza no resultado final de uma cascata de reações entre várias proteínas plasmáticas, denominadas de fatores de coagulação (HOUSSAY; CINGOLANI, 2004).

O ponto principal do processo de hemostasia é a formação do coágulo sanguíneo, no qual acontece a transformação do sangue no estado líquido para o estado sólido. Existem cerca de 30 proteínas interagindo nesse processo, culminando na formação do coágulo após a lesão (KIM *et al.*, 2015). A formação do coágulo sanguíneo em si ocorre devido alterações morfológicas nas plaquetas, causando a liberação de compostos químicos que aumentam a agregação plaquetária, entre eles, vasoconstritores e enzimas que atuam diretamente na formação do coágulo (COLMAN, 2006).

Ao final do processo de formação do coágulo sanguíneo, o fluxo do sangue é restabelecido e a parede do vaso é regenerada, sendo necessário que ocorra a dissolução do coágulo, ou seja, a fibrinólise (AZEVEDO, 2006). Esta ocorre quando o

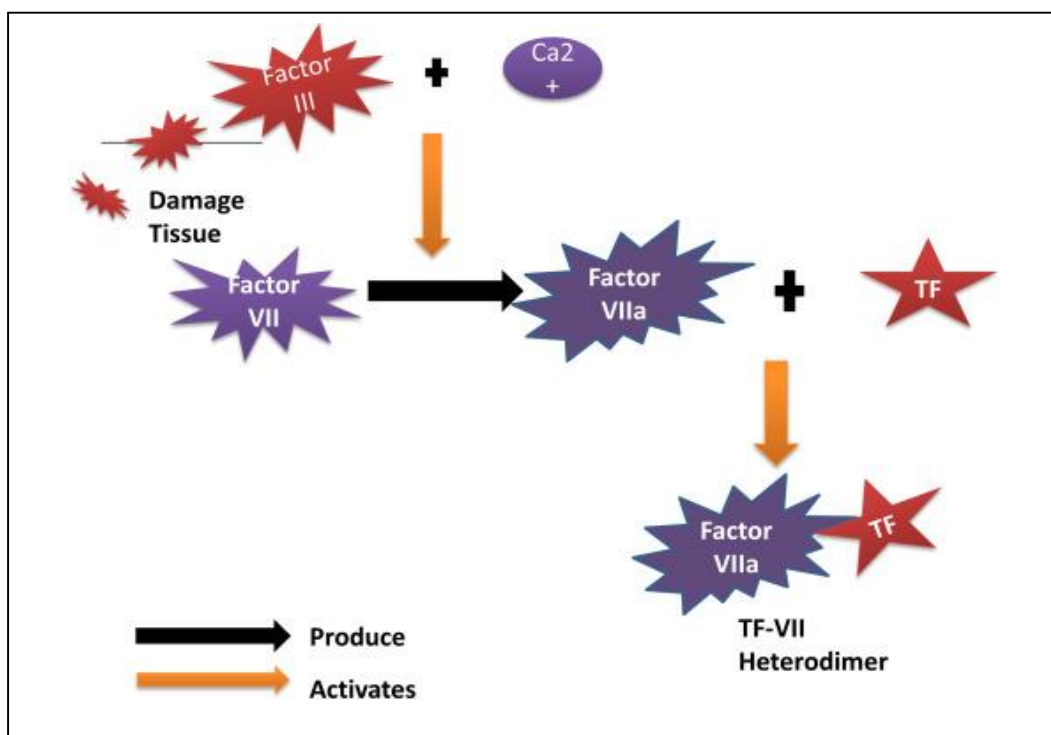
vaso lesionado está reparado, exercendo a função de impedir novos sangramentos (COLMAN, 2006).

O modelo da coagulação sanguínea ocorre em cascata por meio de ativação enzimática (MACFARLANE, 1964), dividindo o processo em via extrínseca, na qual envolve elementos do sangue e também elementos que não estão presentes no espaço intravascular e, a via intrínseca, iniciada por componentes presentes no espaço intravascular, convergindo para uma via comum a partir da ativação do fator X (BANKS, 1991). Essa divisão da cascata de coagulação é apenas didática, porém as vias não ocorrem de maneira independente, podendo ocorrer simultaneamente (VINE, 2009). A via extrínseca tem uma duração entre 8-15 s causada por danos ao tecido fora do vaso, enquanto a via intrínseca ocorre no intervalo entre 1-6 min quando há dano ao vaso sanguíneo (HA; BHAGAVAN, 2011).

O sistema extrínseco inicia-se pelo fator tissular (FT) (Fator III ou tromboplastina), uma glicoproteína transmembrana que não está presente em células que entram em contato com o plasma, contudo quando ocorre injúria vascular as células que expressam o fator tissular ligado à membrana são expostas ao plasma (DAHLBÄCK, 2000; NORRIS, 2003; GENTRY, 2004). Quando o FT exposto no plasma interage com o fator VIIa circulante, ele se torna ativo para formar o complexo enzimático FT-VIIa. O fator VII é uma proteína plasmática dependente de vitamina K produzida no fígado (GENTRY, 2004).

O complexo FT-VIIa na superfície celular apresenta dois substratos em potencial: o fator IX, o qual é convertido a fator IXa e o fator X, o qual é convertido a fator Xa (NORRIS, 2003). A conversão desses dois fatores (X e IX) em suas formas ativas pelo complexo FT-VIIa, necessita da participação de íons de cálcio. Em resumo, na via extrínseca, o fator VII será ativado pelo fator III liberado do tecido danificado, ativando o fator VII com o auxílio do cofator Ca^{2+} , originando o fator VIIa (Figura 4). As etapas que seguem à formação do fator Xa são idênticas para as vias extrínseca e intrínseca (BITHELL, 1993; RAVEL, 1997).

Figura 4 – Representação esquemática da via extrínseca do sistema de coagulação sanguínea. A via extrínseca é desencadeada pelo fator tissular na presença de cálcio, culminando na ativação do fator VII, que ativará o fator X.

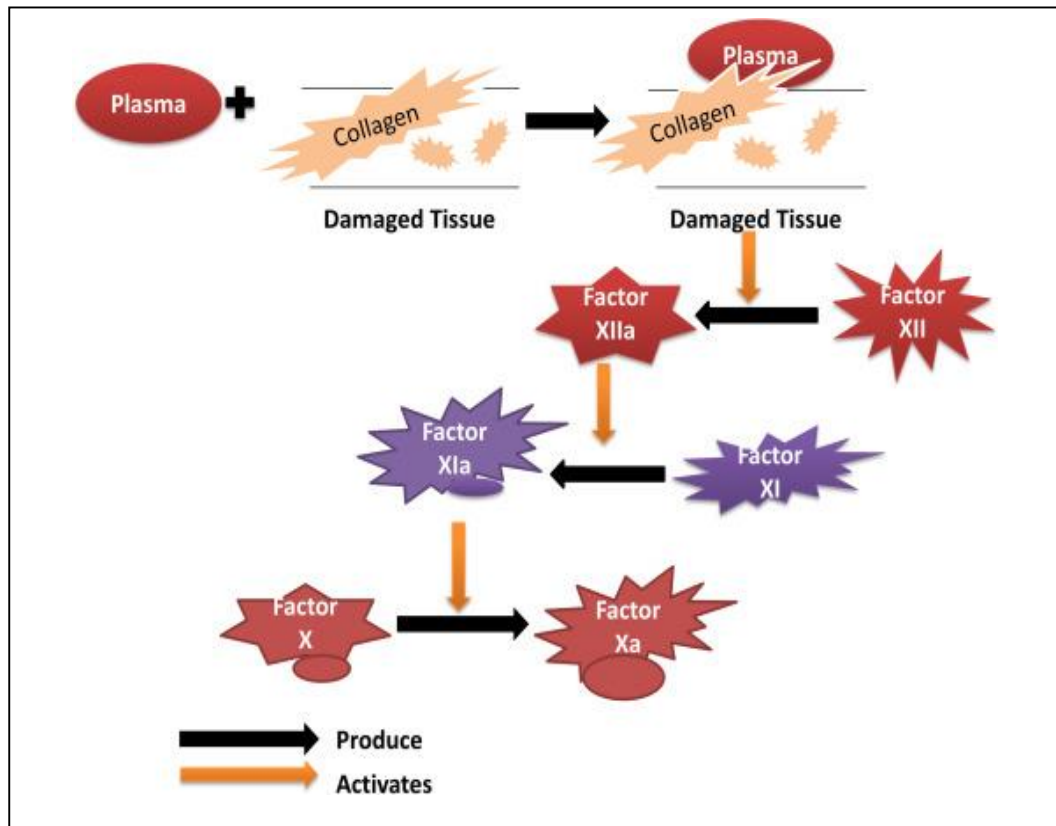


Fonte: JIN; GOPINATH, 2016.

O sistema intrínseco tem início pelo contato entre o sangue e alguma substância estranha, como o colágeno. No interior dos vasos este contato geralmente ocorre após uma lesão no revestimento do endotélio vascular, onde o colágeno é exposto, seguido pela ativação do fator XII, o qual se torna mais hidrofóbico e adquire atividade enzimática. Em resumo, a ativação do fator XI pelo fator XII liberado a partir de plaquetas induz a via intrínseca do sistema de coagulação do sangue, culminando na ativação do fator X (Figura 5) (BITHELL, 1993; RAVEL, 1997; JIN; GOPINATH, 2016).

O fator XIIa juntamente com o cininogênio de alto peso molecular (CAPM), convertem a proenzima précalicreína em calicreína, essa última converte mais fator XII para sua forma ativa (RAVEL, 1997). Com o fator XIIa, ocorre a conversão do fator XI inativo em forma ativa, que por sua vez transforma o fator IX na sua forma ativa. Quando o fator IX é ativado, pela via intrínseca ou pela via extrínseca, ocorre a formação de um complexo com o fator VIIIa, cálcio e fosfolípidos, o qual ativa o fator X em Xa. Este complexo é essencial para a hemostasia (NORRIS, 2004). O fator Xa, juntamente com o fator Va (complexo protrombinase), convertem a protrombina (fator II) em trombina (fator IIa) (JIN; GOPINATH, 2016).

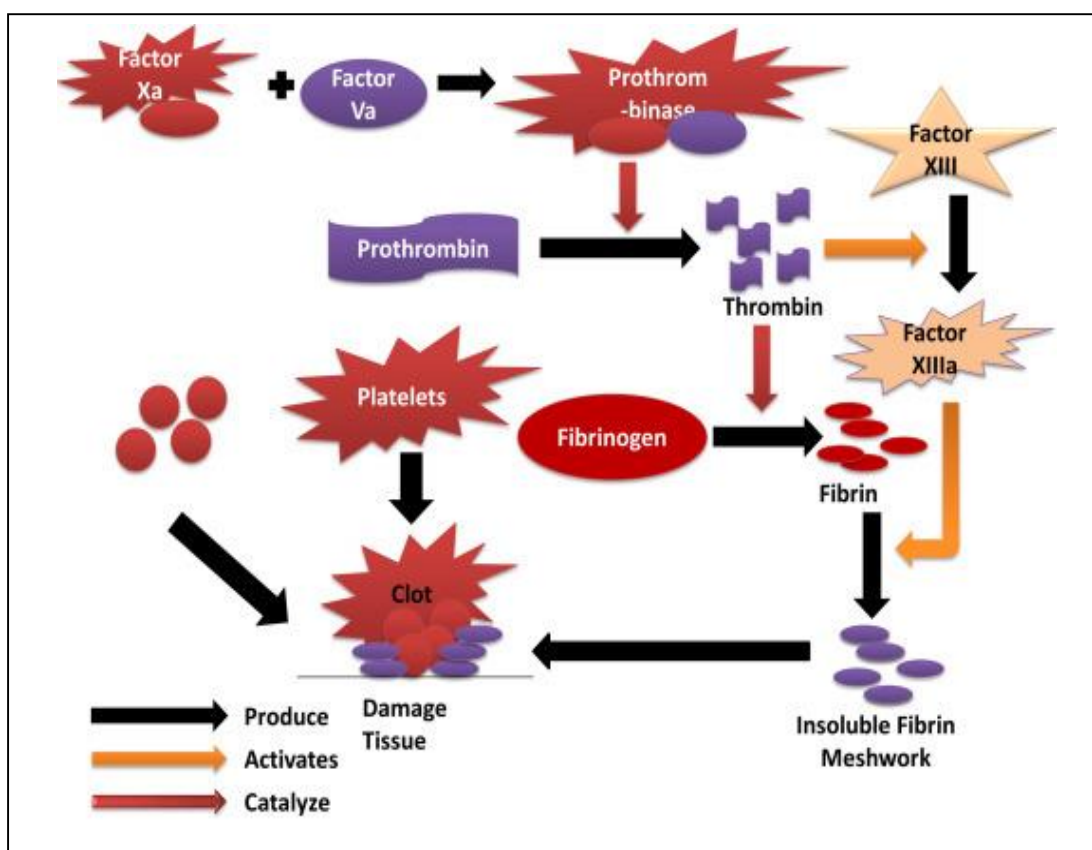
Figura 5 – Representação esquemática da via intrínseca do sistema de coagulação sanguínea. A via intrínseca é desencadeada pelo contato do sangue com alguma substância estranha, culminando na ativação do fator X.



Fonte: JIN; GOPINATH, 2016.

A figura 6 mostra a via comum de coagulação do sangue em caso de lesão. O fator XII está circulando no sangue e é ativado pelo contato do sangue com o colágeno no espaço tecidual. O processo culmina na a ativação do fator XI pelo fator XII (serina protease), o fator XIa ativará o fator X. Como protease, a protrombinase é formada após a ligação e ativação do fator V com o fator Xa, que leva a conversão da protrombina em trombina. Em seguida, as moléculas de fibrina solúveis são formadas pela quebra do fibrinogênio pela trombina. Ao mesmo tempo, a trombina ativa o fator XIII, que é então usado para transformar a fibrina solúvel em malha de fibrina insolúvel, formando o coagulo sanguíneo (JIN; GOPINATH, 2016).

Figura 6 – Representação da via comum do sistema de coagulação sanguínea. A via extrínseca e intrínseca compõe o sistema de coagulação e culminam na via comum.



Fonte: JIN; GOPINATH, 2016

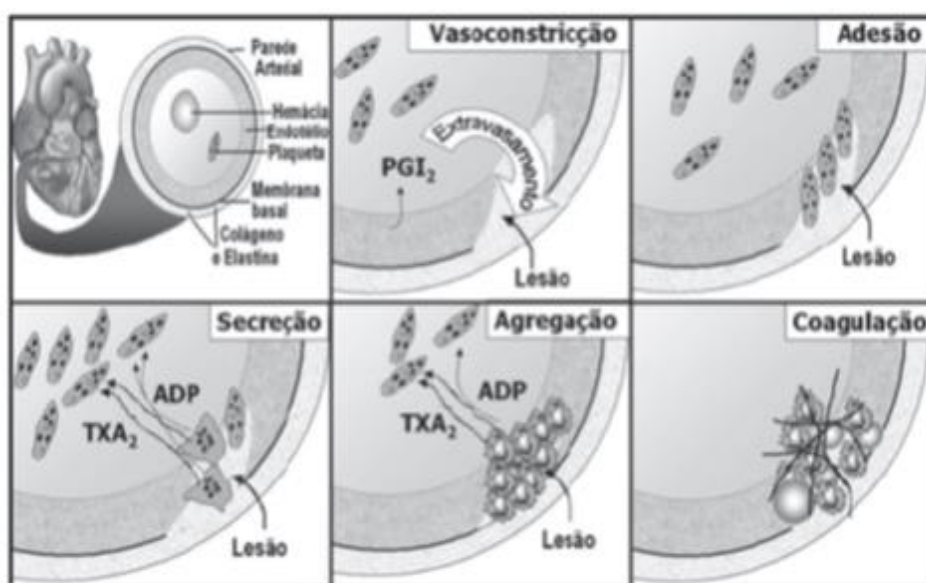
Levando em consideração aspectos bioquímicos e fisiológicos, o processo de conversão do fibrinogênio em monômeros de fibrina ocorre da seguinte forma: os monômeros de fibrina sofrem polimerização e são estabilizados através da introdução de ligações cruzadas entre as moléculas, com a participação do fator XIIIa. Além disso, o fator XIIIa promove algumas reações de *feedback* positivo, convertendo alguns fatores de coagulação (FXI, FVIII, FX, FV, protrombina) na sua forma proteoliticamente ativa e/ou ligando-se a receptores presentes na superfície plaquetária estimulando ainda mais a agregação das plaquetas (FURIE; FURIE, 2000; RAVEL, 1997).

1.6 Agregação Plaquetária

As plaquetas, também denominadas de trombócitos, são corpúsculos anucleados originados das células da medula óssea, os megacariócitos. Essas células

exercem importante função no processo de coagulação do sangue, pois promovem a manutenção do endotélio vascular e reparo do endotélio lesado, exercendo papel central na manutenção da hemostasia (GUYTON; HALL, 2017). Os eventos que acontecem a nível de plaquetas são evidenciados na figura 7.

Figura 7. Os principais eventos plaquetários que ocorrem durante o processo de hemostasia.



Fonte: CASTRO *et al.*, 2006.

Quando ocorre exposição das plaquetas ao colágeno devido à lesão vascular ou contato com substâncias exógenas como vírus e bactérias ou pelas próprias plaquetas (ex.:ADP). Nessas situações, as plaquetas são ativadas e mudam sua conformação da forma discoide para a forma esférica, além disso, ocorre extensa emissão de pseudópodos (MONROE *et al.*, 2002; ANDREWS; BERNDT, 2004). As plaquetas após a ativação também expõem em sua membrana externa fosfolipídios carregados negativamente (fosfatidilserina e fosfatidilinositol), criando uma superfície para a ligação de fatores plasmáticos da coagulação. Essa mudança estrutural da membrana acontece através de mediação intracelular, como a ativação de enzimas translocases, promovendo o aumento de cálcio intracelular e o rearranjo no citoesqueleto (CAUWENBERGHS *et al.*, 2007).

A ativação resulta em um aumento na secreção de substâncias dos grânulos e promove a formação de agregados plaquetários. Como muitos dos estímulos pró-agregatórios (por exemplo, ADP e TXA₂) estão também envolvidos na ativação

plaquetária, ocorre um efeito *feedback* positivo e uma acumulação rápida de plaquetas no sítio da injúria (BHATT, 2008). Ademais, desordens no processo de ativação das plaquetas e coagulação sanguínea estão intimamente relacionados a diversos processos fisiopatológicos, culminando no surgimento de patologias incluído as doenças cardiovasculares que são resultado da formação de trombos, como o acidente vascular cerebral e o infarto do miocárdio (BLANN, 2007).

1.7 Trombose

Apesar dos crescentes avanços na área médica, as doenças cardiovasculares (DCVs) continuam sendo a principal causa de morte no mundo (ROTH *et al.*, 2017). No Brasil, 1.115.695 mortes foram relatadas em 2009, sendo 31% ocasionadas por doenças cardiovasculares (BRASIL, 2010). A incidência de trombose venosa varia entre 1-2 eventos a cada grupo de 1.000 pessoas em cada ano, sendo mais comum em homens do que em mulheres. No entanto, a incidência é aumentada para 1 evento a cada grupo de 100 pessoas em indivíduos com mais de 55 anos de idade (NAESS *et al.*, 2007).

A trombose venosa ocorre pela combinação de fatores que agem como gatilho para o desenvolvimento dessa patologia. Esses fatores são conhecidos como Tríade de Virchow, que incluem aumento da coagulação sanguínea, fluxo sanguíneo alterado (estase) e disfunção endotelial (VIRCHOW, 1862, WOLBERG *et al.*, 2012). O trombo venoso é constituído por pequenas quantidades de plaquetas e são chamados de coágulos vermelhos, devido ao fato de apresentarem altos conteúdos de glóbulos vermelhos e fibrina (WOLBERG *et al.*, 2015).

A interação do sistema de coagulação, juntamente com a ativação e agregação plaquetária, estão intimamente envolvidos com a formação do trombo, podendo desencadear eventos de trombose venosa (BAUER, 2010). Diante disso, as drogas anticoagulantes são os principais modos de tratamento e prevenção de trombose venosa (DE GOTTARDI *et al.*, 2017; WOLBERG *et al.*, 2015).

Um dos anticoagulantes e antitrombóticos mais utilizados é a heparina, que é uma glicosaminoglicana, sulfatada, com massa molar entre 3 a 30 kDa. É um polissacarídeo linear, com unidades alternadas de α -D-glucosamina e ácido hexurônico, com ligações do tipo 1 \rightarrow 4 (GRACHER, 2010). Além disso, ela não apresenta um efeito anticoagulante de forma direta, necessitando da antitrombina

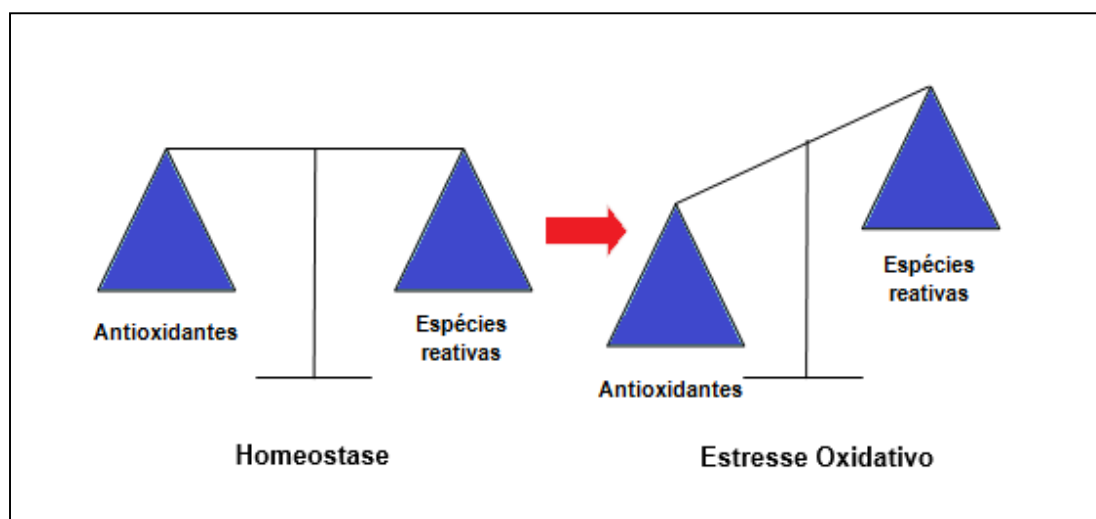
como cofator (COHEN, 2000; JIN; GOPINATH, 2016). A ligação da antitrombina a heparina induz uma mudança na conformação da molécula de antitrombina, a qual potencializa a inibição de várias serina-proteases (IXa, XIa, XIIa, calicreína e os fatores Xa e IIa) (BOURIN; LINDAHL, 1993; JIN; GOPINATH, 2016).

A heparina possui um uso bastante difundido na clínica, porém, é acompanhada de algumas restrições, devido à possibilidade de provocar hemorragia e contaminação por patógenos animais, pois é extraída principalmente de pulmões de bovinos e mucosa intestinal de suínos (DE KORT; BUISMAN; VAN BOECKEL, 2005; GREINACHER; WARKENTIN, 2006; PERRINAUD *et al.*; 2006). Além disso, outras desvantagens incluem trombocitopenia e ligação plasmática não específica, além disso, pode causar disfunção na agregação plaquetária (JIN; GOPINATH, 2016).

1.8 Estresse Oxidativo

O desequilíbrio entre a produção e a remoção de radicais livres dentro de um determinado compartimento celular, causando o acúmulo desses radicais a níveis que perturbem a homeostase celular, ocasionando danos teciduais é definido como estresse oxidativo (Figura 8) (MAYNE, 2003; RITCHIE *et al.*, 2017).

Figura 8 – Representação esquemática do estresse oxidativo.



Fonte: Adaptado de ALENCAR, 2016.

As reações químicas que ocorrem nos sistemas biológicos culminam na formação de diferentes tipos de radicais livres, que são moléculas ou fragmentos

moleculares contendo um ou mais elétrons não emparelhados, conferindo alta capacidade de reação com outras moléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Os radicais livres estão representados em sua maioria pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como exemplo temos o ânion superóxido, radical hidroxila, radical peroxila, peróxido de hidrogênio, hidroperóxido orgânico, oxigênio singlete e ozônio (SILVA; CERCHIARO; HONORIO, 2011). O acúmulo de diferentes tipos de radicais livres pode estar intimamente relacionado a várias patologias que incluem inflamações, câncer, diabetes melitus e doenças cardiovasculares (PASSALI *et al.*, 2015; SILVA; CERCHIARO; HONORIO, 2011).

O estresse oxidativo e as doenças cardiovasculares estão intimamente interligados, pois o excesso de EROs limita os efeitos do NO, impedindo sua ação, ocasionando distúrbios no sistema de coagulação e agregação plaquetária, podendo facilitar o surgimento de doenças tromboembólicas. Diante disso, o uso de moléculas com potencial antioxidante podem prevenir danos oxidativos, promovendo forte ação para a manutenção da homeostase sanguínea (RITCHIE *et al.*, 2017).

Os antioxidantes são definidos, de maneira geral, como compostos que em pequenas quantidades são capazes de prevenir a oxidação de um substrato, reduzindo ou mesmo evitando o dano oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Os antioxidantes possuem o espectro de ação variado e pode agir através de diferentes mecanismos, como: quelantes de íons metálicos, sequestro de radicais livres, decomposição de peróxidos ou mesmo através da inibição de enzimas que estão relacionadas a síntese de radicais livres (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Dentre os principais compostos antioxidantes sintéticos que estão disponíveis no mercado, podemos citar o galato de propileno (GP) e o hidroxitolueno butilado (BHT), porém estudos contraditórios sobre o potencial negativo desses compostos para o homem têm sido reportados (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Além disso, o ácido nordihidroguaiarético (ANDG) apesar de ser um antioxidante bastante utilizado é conhecido por causar doença cística renal em roedores (EVAN; GARDNER, 1979).

Nos últimos anos a busca por compostos antioxidantes de origem natural tem crescido e alguns estudos tem sido realizados utilizando compostos oriundo de algas marinhas (AKBARI; AMINIKHOEI, 2017; CHAKRABORTY *et al.*, 2016; RAJAURIA; FOLEY; ABU-GHANNAM, 2016). Vários estudos têm mostrado que os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas apresentam considerável potencial

antioxidante contra diferentes tipos de radicais livres, sem apresentar toxicidade (BURG; OSHRAT, 2015; YUAN; MACQUARRIE, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a estrutura química dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa* e verificar seu potencial anticoagulante, antiagregante, antitrombótico e antioxidante.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair os polissacarídeos sulfatados da alga *Gelidiella acerosa* (PSGa) por digestão enzimática com papaína.
- Quantificar o teor de carboidratos, proteínas e sulfato nos PSGa.
- Estimar a massa molar dos PSGa através de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) e determinar a estrutura química dos polissacarídeos por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier e por Ressonância Magnética Nuclear de próton (^1H) e carbono (^{13}C).
- Avaliar o efeito dos PSGa quanto a sua atividade anticogulante *in vitro* através dos testes de TTPA e TP.
- Avaliar o efeito dos PSGa sobre a agregação plaquetária *in vitro* induzida por ADP.
- Avaliar o potencial antitrombótico *in vivo* dos PSGa em ratas através do teste de trombose venosa.
- Avaliar a tendência hemorrágica *in vivo* dos PSGa em ratas através do teste de tempo de sangramento por transecção da cauda.
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* através dos testes de capacidade antioxidante total, quelação do íon ferroso, sequestro do radical DPPH e sequestro do radical hidroxila.

3 MATERIAIS

3.1 Alga marinha

A alga vermelha *Gelidiella acerosa*, foi coletada em julho de 2016, na praia de Búzios, no município de Nísia Floresta, Rio Grande do Norte (06°01'S - 35°06'W), Brasil. A espécie foi identificada pela professora Dr. Eliane Marinho Soriano. No momento da coleta a temperatura da água era de 28 °C e salinidade de 36 PSU. Após a coleta, as algas foram transportadas em recipiente térmico em baixa temperatura para o Laboratório de Algas Marinhas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC). No laboratório, as algas foram lavadas com água corrente e separadas de epífitas. Ademais, as algas foram novamente lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente, sendo armazenada para posterior utilização.

3.2 Animais

Ratas Wistar (200-250 g) foram obtidas do Biotério Central da UFC e mantidas no Biotério de Experimentação da UECE. Todos os animais receberam água e ração *ad libitum* e permaneceram em condições controladas de temperatura (22-25 °C) e luminosidade. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA) e aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso Animal da Universidade Estadual do Ceará (CEUA n ° 5748564/2015).

3.3 Plasma humano

O sangue humano foi obtido de doadores saudáveis do Centro de Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) e que não faziam uso de medicamentos. As amostras de sangue foram coletadas em tubos de 3,6 mL contendo citrato 3,2% (9 partes de sangue para 1 parte de citrato de sódio) e centrifugadas para obtenção do plasma, o qual foi utilizado nos protocolos experimentais de coagulação e agregação plaquetária. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a resolução n. ° 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil.

3.4 Aspectos éticos e legais

Para a obtenção do plasma humano, a pesquisa obedeceu aos princípios da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, assegurando aos sujeitos participantes o sigilo de suas identidades e garantia de participação voluntária, podendo afastar-se a qualquer momento da pesquisa e da doação do sangue sem qualquer ônus financeiro e/ou material ou prejuízo nas atividades. Os participantes foram orientados sobre os objetivos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do Centro de Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

3.5 Drogas e reagentes

1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio (DSS), acetato de sódio, acetona, ácido ascórbico, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido tricloroacético, adenosina difosfato (ADP), albumina sérica bovina, álcool etílico, álcool metílico, azul de toluidina, cisteína, cloreto de cetilpiridínio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, comassie G-250, ferrozina (ácido 3-(2-piridil) 5,6-difenil-1,2,4-triazina-p-p'-disulfônico), fosfato de sódio, galactose, heparina, hidróxitolueno butilado (BHT), ketamina, molibdato de amônio, nitrato de sódio, n-butanol, papaína bruta, peróxido de hidrogênio, sulfato ferroso, xilazina e kits para Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) e Tempo de protrombina (TP). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4. MÉTODOS

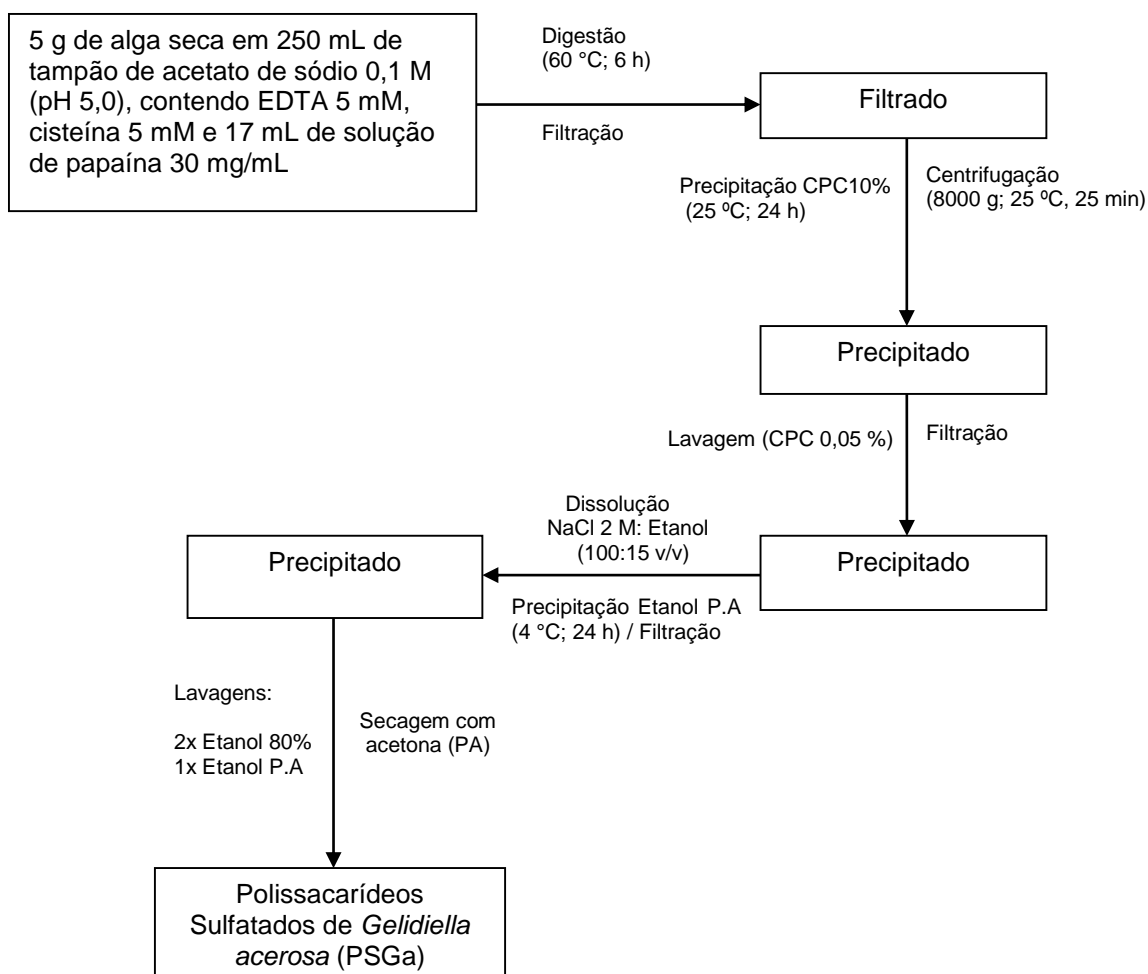
4.1 Extração dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa*

A extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa* foi realizada de acordo Farias *et al.* (2000), com modificações. Primeiramente, a alga foi despigmentada através de exposição ao sol e aspergida com água periodicamente, em seguida, desidratada em temperatura ambiente e macerada com triturador mecânico até a obtenção do pó. Este (5 g) foi macerado com a utilização de nitrogênio líquido, sendo suspenso em 250 mL do tampão de extração acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0 contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM e digerida com 17 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg/mL), após isso a mistura incubada a 60 ° C durante 6 horas.

A mistura foi então filtrada em membrana de nylon e o filtrado obtido foi reunido. Os polissacarídeos sulfatados, presentes no filtrado, foram precipitados com a adição de 16 mL de solução de cloreto de cetilpiridínio (CPC) 10%. Após 24 h, a temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 8000 × g durante 25 min a 25 °C. Os polissacarídeos sulfatados foram lavados com 500 mL de solução de 0,05% de CPC. Em seguida, os polissacarídeos sulfatados foram filtrados e dissolvidos em 100 mL de uma solução de NaCl-Etanol (100: 15 v/v).

Os polissacarídeos sulfatados da mistura foram precipitados com 300 mL de etanol absoluto. Após 24 h, a 4 °C, o precipitado foi recolhido por filtração e lavado exaustivamente com etanol a 80% (500 mL), etanol absoluto (300 mL) e secados com acetona. A partir desse processo foram obtidos os polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa*, que foram denominados de PSGa (Figura 9).

Figura 9 - Esquema de extração enzimática do polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa*.



O cálculo do rendimento dos PSGa foi obtido em relação ao peso da alga seca utilizado para extração e foi obtido através da seguinte equação:

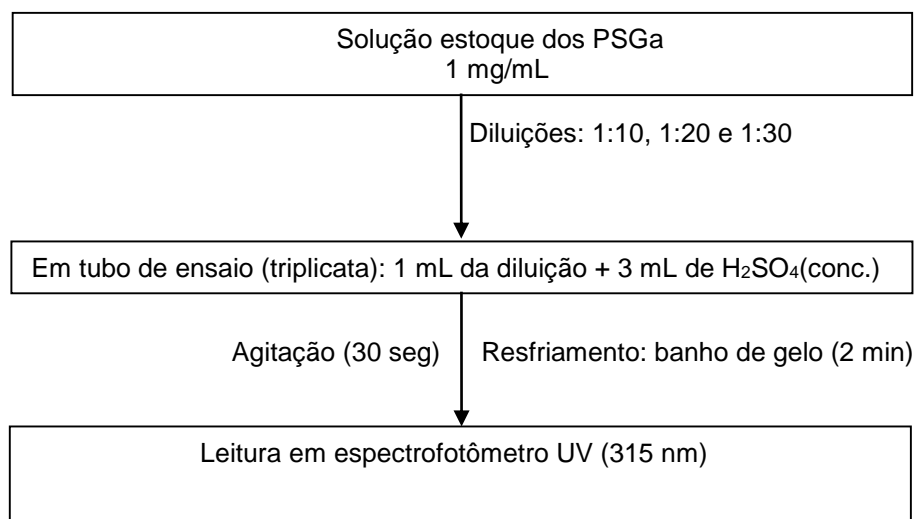
$$\text{Teor de ágar \%} = \frac{\text{Massa (g) do extrato seco obtido}}{\text{Massa (g) de macroalga seca utilizada para o processo de extração}} \times 100$$

4.2 Análises químicas e estruturais dos polissacarídeos sulfatos de *Gelidiella acerosa*

4.2.1 Quantificação do conteúdo de carboidratos

A determinação do teor de carboidratos foi realizada pelo método de Albalasmeh; Berhe e Ghezzehei (2013). A partir de uma solução estoque de 1 mg/mL dos PSGa foram realizadas três diluições em proporções diferentes (1:10, 1:20 e 1:30). Em seguida, 1 mL de cada diluição foi separado em tubos de ensaio para posterior adição de 3 mL de ácido sulfúrico, seguido de agitação por 30 segundos. Posteriormente, a solução foi colocada em banho de gelo por 2 minutos até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a leitura de absorvância a 315 nm em espectrofotômetro ultravioleta (UV). Todas as concentrações foram realizadas em triplicata (Figura 10). Foi realizada a curva padrão de galactose substituindo os polissacarídeos por uma solução de galactose (10 a 100 µg/mL), permitindo assim a quantificação dos PSGa por correlação com a curva de calibração.

Figura 10 - Esquema de quantificação do conteúdo de carboidratos.



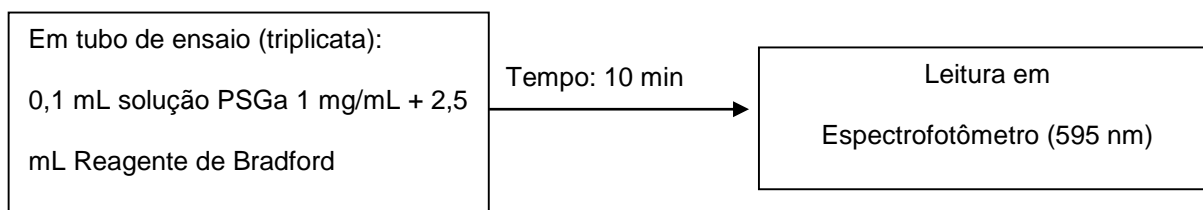
4.2.2 Quantificação do conteúdo de proteínas contaminantes

O conteúdo de proteínas contaminantes foi determinado através do método proposto por Bradford (1976). Foi realizada a confecção de uma curva padrão com Albumina Sérica Bovina (BSA) e todas as análises foram realizadas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595 nm. Todas as concentrações foram analisadas em triplicata.

Para quantificar o teor de proteínas da amostra, foram utilizadas soluções de 1 mg/mL dos PSGa. A partir dessas soluções, 0,1 mL foi adicionado a 2,5 mL de solução de Bradford e após 10 minutos foram realizadas as leituras em

espectrofotômetro a 595 nm. A análise foi realizada em triplicata (Figura 11). A estimativa das concentrações de proteínas foi realizada através da correlação entre as leituras obtidas das soluções contendo as amostras e as da curva padrão de BSA.

Figura 11- Esquema de quantificação do conteúdo de proteínas contaminantes.



4.2.3 Quantificação do conteúdo de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre

A porcentagem de carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre nos PSGa foi estimada usando um analisador CHNS PerkinElmer 2400 Series II (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). A análise foi realizada de acordo com Maciel *et al.* (2008). O grau de sulfatação foi determinado baseado nos percentuais de carbono (C%) e enxofre (S%) a partir da equação abaixo:

$$\text{Teor de sulfato \%} = \frac{(\text{S\%} / \text{massa atômica S})}{(\text{C\%} / \text{massa atômica do C} \times 12)} = 4,5 \times \left(\frac{(\text{S\%})}{(\text{C\%})} \right) \quad \text{Eq. (1)}$$

Para a determinação do grau de sulfatação por unidade dissacarídica repetitiva é necessário o conhecimento da estrutura do PSGa, que é formado por dissacarídeos contendo um β -D-galactopiranosose (Unid A) com outro α -L-galactopiranosose ou 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose (Unid B). Visto que o teor de sulfatação é definido como o número de OSO_3^- , ou átomos de enxofre, por unidade AB, com 12 átomos de carbono, então o número 12 multiplicado pela massa atômica do carbono corresponde ao número de carbonos por unidade dissacarídica.

A homogeneidade da amostra foi confirmada por microanálise, para a determinação do conteúdo de proteínas utilizou-se a porcentagem de N utilizando o fator de correção de 6,25, conforme proposto por Marks, Buchsbaum e Swain (1985).

4.2.4 Determinação da massa molar média por cromatografia de permeação em gel

A determinação da massa molecular média dos PSGa foi realizada por cromatografia de permeação em gel (GPC) com concentração de 1 mg/mL em NaNO₃ (0,1 M). A cromatografia ocorreu em equipamento Shimadzu usando uma coluna Ultrahydrogel linear (7,8 x 300 mm), com fluxo de 0,5 mL/min. Um refratômetro diferencial e um fotômetro de raios ultravioleta (a 280 nm) foram utilizados como detectores e o volume de eluição corrigido para o marcador interno de etileno glicol a 11,25 mL. Foram utilizadas amostras de pululanas (Shodex Denko), com massas moleculares variáveis (103-106 mg/mol) como padrão para a obtenção da curva de calibração

4.2.5 Caracterização química por espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com espectrômetro de Infravermelho com transformada de Fourier da Shimadzu, modelo FTIR-8300, apresentando uma região espectral de 4000 a 400 cm⁻¹. Pastilhas de brometo de potássio (KBr) foram utilizadas para a análise da amostra.

4.2.6 Determinação da estrutura química por ressonância magnética nuclear

Os espectros de ¹H e ¹³C uni (1D) e bidimensionais (2D) de RMN foram realizados, utilizando-se espectrômetro Bruker Avance DRX 500. Os PSGa foram dissolvidos em água deuterada (D₂O) a 2,5% m/v. A análise dos PSGa foi realizada a 70 °C por 12 horas, utilizando 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) como padrão interno (0,00 ppm por ¹H).

4.3 Atividades anticoagulante e antiagregante plaquetária in vitro

4.3.1 Tempo de tromboplastina parcialmente ativada

O teste de tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) foi realizado em triplicata, seguindo as recomendações do fabricante e analisados em coagulômetro (CLOTimer DRAKE, Brasil). Para realização do teste, utilizou-se plasma humano e a heparina foi utilizada como controle positivo. Para o ensaio de TTPA, foram adicionados 10 µl dos PSGa (0,01-2 mg/mL), heparina (0,025-0,1 µg/mL) ou solução salina a 90 µl de plasma humano normal incubados a 37 ° C durante 1 min, sob agitação magnética. Após a incubação, foi adicionado 100 µl de cefalina à mistura e incubado nas mesmas condições durante 3 min. A reação foi iniciada pela adição de 100 uL de CaCl₂ (0,25 M) e o tempo de coagulação foi avaliado. A atividade anticoagulante foi expressa em segundos, levando em consideração a relação entre o tempo de coagulação em presença (T₁) e ausência (T₀) dos PSGa ou heparina.

4.3.2 Tempo de protrombina

O teste de tempo de protrombina (TP), foi realizado em triplicata, seguindo as recomendações do fabricante e analisados em coagulômetro (CLOTimer DRAKE, Brasil). Para realizar o teste, utilizou-se plasma humano e a heparina foi utilizada como controle positivo. Para o ensaio de TP, foram adicionados 10 µL dos PSGa (0,01-2 mg/mL) ou heparina (0,025-0,1 µg/mL) ou solução salina a 90 µL de plasma humano normal e incubou-se a 37 °C durante 5 minutos, sob agitação magnética. Após o período de incubação, a reação foi iniciada pela adição de 200 µL de tromboplastina e o tempo de coagulação foi avaliado. A atividade anticoagulante foi expressa em segundos, levando em consideração a relação entre o tempo de coagulação em presença (T₁) e ausência (T₀) dos PSGa ou heparina.

4.3.3 Agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi avaliada por análise de turbidimetria de acordo com Born e Cross (1963), utilizando agregômetro (Qualitem PA.04, Brasil) acoplado a um registrador. O sangue foi obtido de doadores saudáveis e o plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação (118 × g, 10 min), a temperatura ambiente. Em resumo, 450 µL de PRP foram incubados (37 °C, 1 min) em uma cubeta, sob agitação magnética no agregômetro, juntamente com 10 µL de PSGa ou heparina nas mesmas concentrações (10, 50, 100, 150 e 200 µg/µL), após isso foi adicionado

à mistura o agente agregante (ADP 3 μ M, 30 μ L) e observada a agregação durante 5 min. O ensaio para avaliação da agregação plaquetária foi realizado em triplicata e avaliada na ausência ou presença de ADP. A agregação foi quantificada em relação à extensão máxima do aumento da transmitância da luz e os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao ADP (100% T). Para calibrar o agregômetro foi utilizado o plasma pobre em plaquetas (PPP), obtido pela centrifugação do sangue residual (1062 \times g, 15 min).

4.4 Atividades anticoagulante e antitrombótica *in vivo*

4.4.1 Trombose venosa

A trombose venosa foi induzida em ratas, promovendo uma combinação de estase e hipercoagulabilidade (VOGEL *et al.*, 1989). Inicialmente, as ratas (200-250 g) foram anestesiadas e a cavidade abdominal foi exposta e dissecada para a implantação de suturas soltas em um segmento de 0,7 cm entre as veias renais. Para a realização do teste como controle negativo foi utilizado salina e heparina como controle positivo. Em seguida, foram administrados PSGa (0,01-2 mg/kg), heparina (0,05 mg/kg) ou solução salina e a circulação sanguínea normal foi mantida durante 5 min. Após isolar a veia cava abdominal, foi administrado tromboplastina cálcica (5 mg/kg) por via intravenosa e um segmento de 0,7 cm foi bloqueado por suturas distal e proximal. Após 20 min, a estase local foi promovida e o trombo foi removido, seco durante 1 h (60 °C) e pesado. Para cada grupo (n = 6), os resultados foram expressos como porcentagem de peso do trombo.

4.4.2 Tendência hemorrágica

O ensaio do tempo de sangramento foi realizado de acordo com Martinichen-Herrero *et al.* (2005). Ratas (200-250 g) foram pré-anestesiadas e a veia jugular esquerda canulada para administração dos PSGa. Salina foi usada como controle negativo e heparina como um controle positivo. Foram administrados PSGa (0,01 a 2 mg/kg), heparina (0,05 mg/kg) ou solução salina na veia jugular e 5 min após a aplicação, 3 mm da extremidade terminal das caudas dos animais foram incisadas

e os tempos de sangramento foram registrados. Para cada grupo (n = 6), os resultados foram expressos como tempo de sangramento (s).

4.5 Atividade antioxidante *in vitro*

4.5.1 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total dos PSGa foi baseada na redução de Mo (VI) para Mo (V), conforme descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Inicialmente, adicionou-se 300 µL dos PSGa (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 mg/mL) a uma solução de 3 mL contendo os seguintes reagentes: solução de molibdato de amônio (4 mM), ácido sulfúrico (0,6 M) e fosfato de sódio (28 mM). Após 90 min a 95 °C a mistura foi arrefecida e a sua absorvância foi determinada (695 nm). O ácido ascórbico (AA) foi utilizado como controle positivo e seu potencial antioxidante foi considerado como 100% de atividade antioxidante. Todas as reações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem de inibição de oxidação de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Capacidade antioxidante total (\%)} = [(A1 - A2) / (A0 - A2)] \times 100$$

Onde A0 = AA; A1 = PSGa; e A2 = Branco

4.5.2. Quelação do íon ferroso

A capacidade de quelação de íons férricos dos PSGa foi determinada de acordo com o método de Chew *et al.* (2008), com algumas modificações. Resumidamente, foram adicionados 1 mL de sulfato ferroso (0,1 mM) e 1 mL de ferrozina (0,25 mM) aos PSGa (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 mg/mL). Após 10 min a temperatura ambiente, a absorvância da mistura foi medida a 562 nm contra o branco (água destilada e reagentes). O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi utilizado como controle positivo. Todas as reações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem de atividade quelante como mostrado abaixo:

$$\text{Atividade quelante (\%)} = [A0 - (A1 - A2) / A0] \times 100$$

Onde A0 = FeSO4 + Ferrozina; A1 = PSGa ou EDTA + FeSO4 + Ferrozina; e A2 = PSGa ou EDTA sem FeSO4 + Ferrozina

4.5.3 Sequestro do radical DPPH

A capacidade de eliminação de radicais livres de 1,1-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH) foi realizada como descrito por Blois (1958), com algumas modificações. Inicialmente, os PSGa (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 mg/mL) foram incubados numa solução de 3 mL de metanol e DPPH (75 µM) e mantidos durante 30 min a 25 °C na ausência de luz. A absorbância foi medida a 517 nm e o hidroxitolueno butilado (BHT) foi utilizado como controle positivo. Todas as reações foram realizadas em triplicata e a atividade de eliminação de DPPH foi calculada da seguinte forma:

Atividade de eliminação do radical DPPH (%) = $[A0 - (A1 - A2) / A0] \times 100$

Onde A0 = DPPH; A1 = PSGa ou BHT + DPPH; e A2 = PSGa ou BHT sem DPPH.

4.5.4 Eliminação do radical hidroxila

A atividade de eliminação do radical hidroxila foi determinada de acordo com Cui-qin e Zhe-zhi (2008), com modificações. Resumidamente, foi adicionado PSGa (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 mg/mL) à mistura contendo 1 mL dos seguintes reagentes: H2O2 (1 mM), sulfato ferroso (2 mM) e salicilato (6 mM) e foi incubada a 37 ° C durante 15 min. A absorbância foi medida a 520 nm e AA foi utilizado como controle positivo. Todas as reações foram realizadas em triplicata e a porcentagem de inibição do radical hidroxila foi calculada da seguinte forma:

Atividade de eliminação do radical hidroxila (%) = $1 - (A1 - A2) \times 100$

Onde A1 = PSGa; e A2 = A

4.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm S.E.M e analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de

Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0. Valores de $p < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e rendimento dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa*

A extração enzimática é uma técnica bastante difundida para a obtenção de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas (FARIAS *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2010), uma vez que o rendimento considerável e o baixo custo do processo são os motivos de sua larga utilização na extração dessas biomoléculas, tanto para algas marinhas de diferentes espécies, como de diferentes gêneros (WANG *et al.*, 2013).

A extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gelidiella acerosa* a partir de 5 g de alga seca, resultou em 355 mg de PSGa, o equivalente a um rendimento de 7,1%, que apesar de ser considerado baixo, esse rendimento pode ser compensado pela alta disponibilidade de alga marinha. Esse rendimento é semelhante aos obtidos para outras espécies de algas vermelhas como demonstrado por Maciel *et al.* (2008), em que a alga marinha *Gracilaria birdiae* apresentou um rendimento de 6,5% e por Praiboon *et al.* (2006), que após extração dos polissacarídeos da espécie *Gracilaria edulis* demonstraram um rendimento de 10,9%. O rendimento obtido mostrou-se superior quando comparado ao rendimento resultante da alga vermelha *Gelidium crinale*, cujo o processo de extração também empregou a digestão enzimática (PEREIRA *et al.*, 2005).

Variações de rendimento resultantes do processo de extração de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas são bastante comuns. O rendimento obtido nesse estudo se enquadra a valores encontrados para outras espécies de algas marinhas vermelhas da costa brasileira, que apresentam rendimento variando de 2,4 a 46%. Vários fatores podem afetar o rendimento de polissacarídeos presentes nas algas, como a espécie, a metodologia utilizada para a extração, fatores fisiológicos, estágio de vida, variações sazonais e mesmo o local de origem dos espécimes (MARINHO-SORIANO; BOURRET 2003; ROMERO; VILLANUEVA; MONTAÑO, 2008).

5.2 Análises químicas e estruturais dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa*

5.2.1 Quantificação do conteúdo de carboidratos

Os PSGa apresentaram teores de carboidratos equivalente a 89,5%. Esse conteúdo de carboidrato é considerado alto e foi semelhante ao obtido para alga marinha vermelha *Gracilaria corticata* (84%) (SEEDEVI *et al.*, 2017). Valores semelhantes foi observado para a espécie *Hypnea musciformis* (98%), utilizado o mesmo método de extração e de quantificação de carboidratos (SOUSA *et al.*, 2016).

A espécie *Gracilaria debilis* apresentou teores de carboidratos de apenas 52,65%, utilizando o método de extração aquosa (SUDHARSAN *et al.*, 2015). Talvez esse baixo teor de polissacarídeos tenha sido devido ao método de extração empregado, pois ele é bem menos específico do que o utilizado nesse trabalho. O método de extração enzimática faz uso da papaína visando o rompimento da parede celular das algas, liberando maiores quantidades de polissacarídeos sulfatados, o que facilita sua extração, melhorando o rendimento.

5.2.2 Quantificação do conteúdo de proteínas contaminantes

A quantificação espectrofotométrica de proteínas nas soluções dos PSGa foi correlacionada com a curva de calibração de BSA. Os PSGa apresentaram resultado negativo no teste de Bradford, demonstrando a possível ausência de proteínas na amostra. Baixas quantidade de proteínas são observadas após extração enzimática com papaína como demonstram os trabalhos de nosso grupo de pesquisa (BARROS *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2016). O alto teor de carboidratos e a possível ausência de proteínas demonstra a eficiência do método de extração enzimática, evidenciando a pureza do material obtido. Além disso, evidencia que nesse caso não foram necessários passos extras de purificação para a obtenção de uma molécula com considerável grau de pureza.

5.2.3 Quantificação do conteúdo de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre

As amostras dos PSGa apresentaram teor de enxofre de 4,5% e teor de carbono de 32%, mostrando grau de sulfatação (DS) de 0,63 (Tabela 1). O DS obtido é considerado alto quando comparado para os polissacarídeos obtidos de *Gracilaria cornea* que mostraram DS variando entre os intervalos de 0,15 a 0,22 (MELO *et al.*, 2002). O valor obtido também foi superior aos polissacarídeos sulfatados da alga

vermelha *Gracilaria caudata* com DS de 0,13 (BARROS *et al.*, 2013). O teor de sulfatos de polissacarídeos sulfatados variam de acordo com as espécies de algas marinhas, além das diferentes condições ambientais em que são submetidas (GARCIA-VAQUERO, *et al.*, 2017). Além disso, teores elevados de sulfato são interessantes sob o ponto de vista biotecnológico, pois podem estar relacionado diretamente à atividade anticoagulante de polissacarídeos de algas marinhas (POMIN; MOURÃO, 2008).

Tabela 1 - Análises químicas dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa*

Amostra	Rendimento (%)	Carboidratos (%) ^a	Proteínas (%) ^b	Sulfato (DS) ^c	Análises CHNS (%) ^c			
					C	H	N	S
PSGa	7,1	89,5	nd	0,63	32	5,4	nd	4,5

^a Determinado de acordo com Albalasmeh, Berhe e Ghezzehei (2013).

^b Determinado de acordo com Bradford (1976).

^c Determinado por microanálise de acordo com Maciel *et al.* (2008).

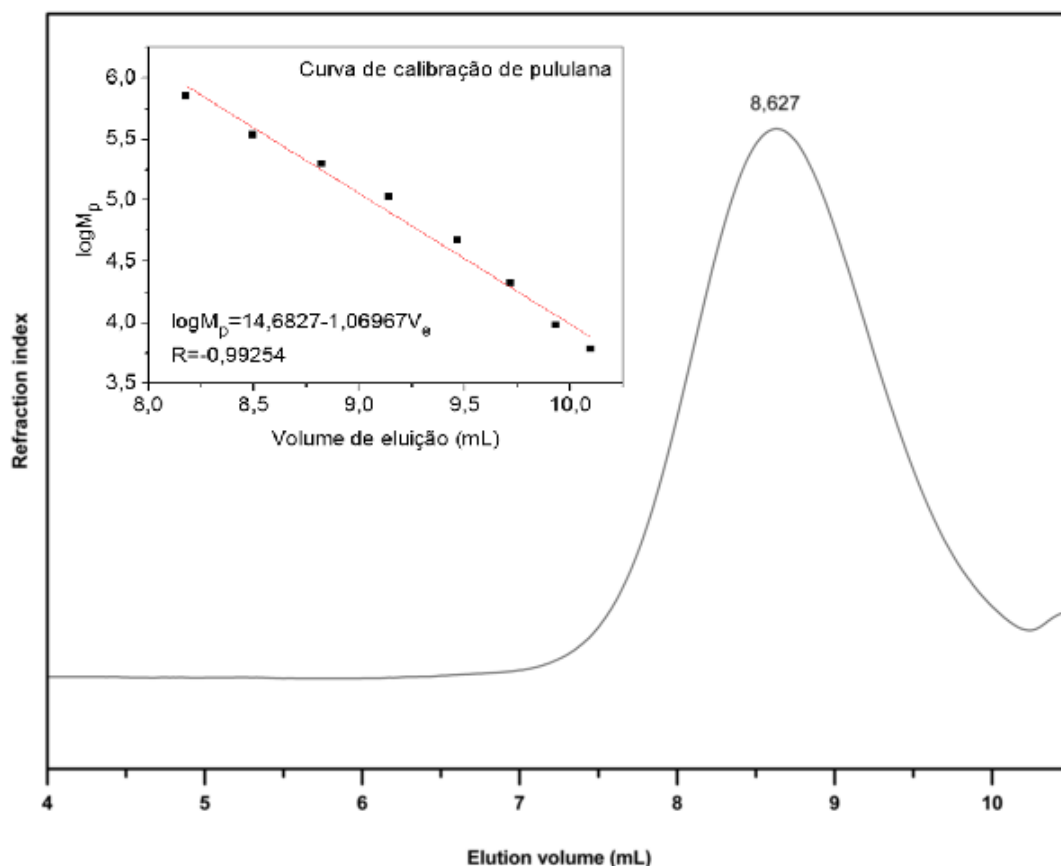
A microanálise confirmou a ausência de nitrogênio na amostra, confirmando a ausência de contaminantes proteicos como já havia sido evidenciado pelo método colorimétrico, demonstrando o alto grau de pureza dos polissacarídeos sulfatados obtidos de *G. acerosa*.

5.2.4 Determinação da massa molar por cromatografia de permeação em gel

O método de cromatografia de permeação em gel é adequado para a análise de polissacarídeos sulfatados de acordo com seu peso molecular, uma vez que possui alta linearidade, precisão e sensibilidade (GÓMEZ-ORDÓÑEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; RUPÉREZ, 2012). O cromatograma obtido dos PSGa mostrou um único pico a 8,627 mL (Figura 12). Usando a curva de calibração de pululanas, a massa molar média de PSGa foi de 284,8 kDa. As galactanas sulfatados extraídas de algas marinhas vermelhas geralmente possuem alta massa molecular (POMIN; MOURÃO, 2008) e uma massa molar polidispersa como demonstrado para os polissacarídeos sulfatados obtidos das espécies *Gracilaria caudata* (BARROS *et al.*, 2013) e *Solieria*

filiformis (SOUSA *et al.*, 2016), cujas as massas moleculares foram determinadas pelo mesmo método de cromatografia de permeação em gel.

Figura 12 - Perfil cromatográfico de permeação em gel dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa*.



Os polissacarídeos exibem massas molares médias, pois ao invés de apresentarem massas precisas, são moléculas de comportamento polidisperso. Além disso, apesar dos polissacarídeos de algas marinhas apresentarem semelhança química, existem uma infinidade de variações no tamanho da cadeia polissacarídica, assim como nos graus de sulfatação e metilação. Essas singularidades conferem a essas moléculas diferentes estruturas químicas e diferentes massas moleculares (POMIN, 2010; STEPHEN, 1995).

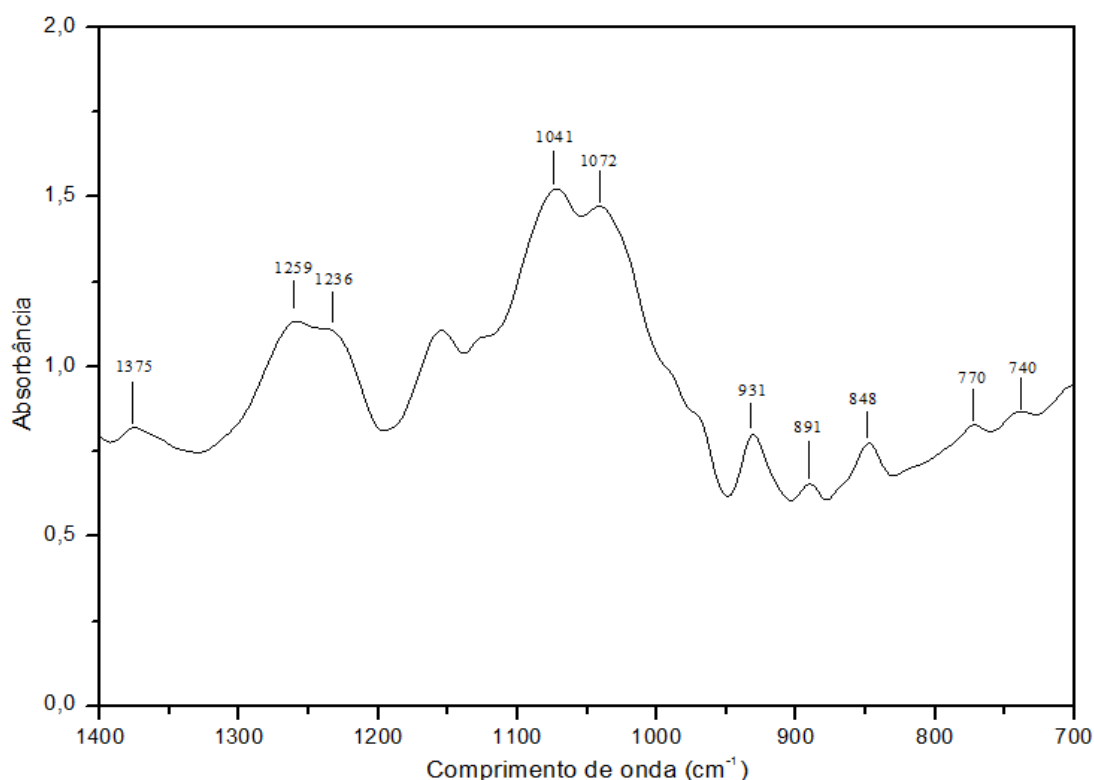
Em estudos realizados por Pomin *et al.* (2004), foi mostrada a relação entre o peso molecular dos polissacarídeos sulfatados e sua atividade anticoagulante, nesses estudos foi evidente que polissacarídeos sulfatados de

algas marinhas requeria cadeias significativamente mais longas do que os glicosaminoglicanos de mamíferos para apresentar efeito anticoagulante.

5.2.5 Caracterização química por espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica bastante difundida para o estudo e caracterização de ficocolóides. A técnica baseia-se na frequência de vibrações específicas das moléculas, sendo bastante utilizada devido ao fato de necessitar de quantidades mínimas da amostra e por ser um método bastante confiável (PEREIRA *et al.*, 2003; SEEDEVI *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2017). O espectro na região do infravermelho com transformada de Fourier dos PSGa na região de 1400 e 700 cm^{-1} está representando na Figura 13.

Figura 13 - Espectro de absorção na região do infravermelho dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa*.



O espectro obtido exibe a identificação dos grupos funcionais presentes na molécula. Os PSGa mostraram um perfil característico de polissacarídeos de algas

marinhas vermelhas do tipo agarofita, o qual é identificado através da presença da banda espectral na região de 891 cm^{-1} , característica de galactanas do tipo ágar (MOLLET; RHAOUI; LEMOINE, 1998; PEREIRA; GHEDA; RIBEIRO-CLARO, 2013).

Além disso, os espectros mostraram outros picos característicos de agarofitas, com bandas características em 1375, 1259, 1236, 1072, 1041, 931, 848, 770 e 740 cm^{-1} (Tabela 2). As bandas em 1375 e 1259 cm^{-1} correspondem a grupos éster sulfato na molécula (SALEHI *et al.*, 2011; ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986). Já a banda intensa a $1072\text{-}1041\text{ cm}^{-1}$ foi atribuída ao esqueleto de galactanas (C-O + C-OH) (MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998). As bandas a 931 e 891 cm^{-1} indicam a presença de 3,6-anidrogactose e gactose, respectivamente (CHRISTIAEN; BODARD, 1983; ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986). A banda a 848 cm^{-1} é a β - D-gactose-4-sulfato (BERTASA *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2002). Além disso, a região dos espectros entre $770\text{ e }740\text{ cm}^{-1}$ apresenta outras bandas características de ágar atribuídas à flexão esquelética de anéis de piranose (BERTASA *et al.*, 2017).

A presença de grupamentos sulfatos foi confirmada por FTIR, mostrando que os PSGa contêm grupamentos sulfatos em sua estrutura química. Em agarofitas, o grupamento sulfato está ligado aos resíduos de gactose do esqueleto do polissacarídeo na forma de éster (O-SO_3^-) e desempenha um papel importante nas propriedades biológicas das algas, em especial para a atividade anticoagulante e antitrombótica (LIANG *et al.*, 2014; MOURÃO, 2015).

Tabela 2 - Atribuições no espectro do infravermelho para grupamentos de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas

Comprimento de onda (cm^{-1})	Grupamentos atribuídos	Referência
1375-1259	Éster de Sulfato	Prado; Fernandes; Natale, 2003; Rochas; Lahaye; Yaphe, 1986; Salehi <i>et al.</i> , 2011
1236	O=S=O (estiramento assimétrico)	Chopin; Whalen, 1993; Prado; Fernandes; Natale, 2003;
1072-1041	Esqueleto de galactanas (C-O + C-OH)	Mollet; Rahaoui; Lemoine, 1998; Prado; Fernandes; Natale, 2003.

931	C-O-C de 3,6-anidrogactose	Christiaen; Bodard, 1983; Chopin; Whalen, 1993; Prado; Fernandes; Natale, 2003; Rochas; Lahaye; Yaphe, 1986.
891	Banda específica do ágar	Mollet; Rhaoui; Lemoine, 1998; Pereira; Gheda; Ribeiro-Claro, 2013
848	β -D-gactose-4-sulfato	Bertasa et al., 2017; Melo et al., 2002; Villanueva et al., 2010.
770-740	Anéis de piranose	Bertasa et al., 2017

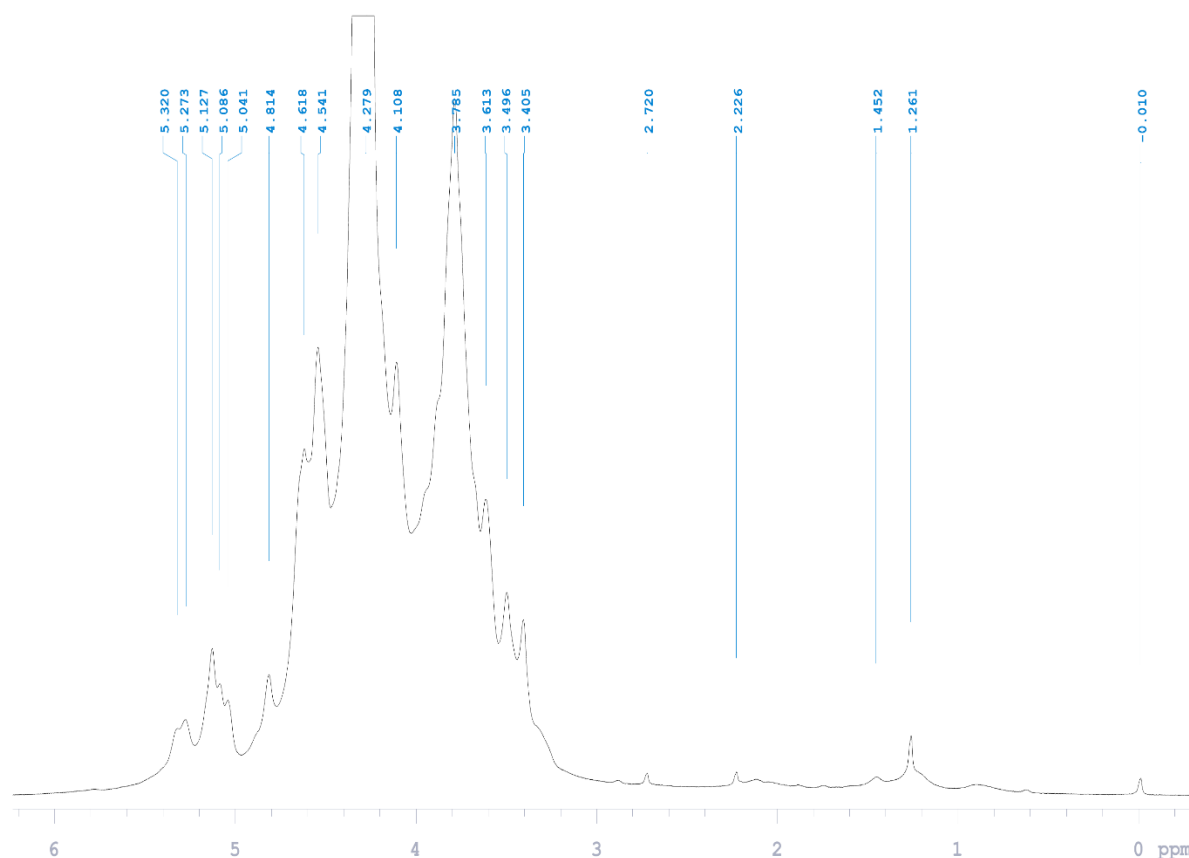
5.2.6 Determinação da estrutura química por ressonância magnética nuclear RMN

A análise de RMN foi utilizada para examinar a estrutura química dos polissacarídeos de *Gelidiella acerosa*, uma vez que esta metodologia é bastante difundida e utilizada para avaliar as características estruturais de vários polímeros, incluindo grandes moléculas como os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas (ANAND et al., 2018; USOV, 1998; USOV; YAROTSKY; SHASHKOV, 1980).

Os espectros de RMN do ^1H confirmaram que os polissacarídeos de *Gelidiella acerosa* são do tipo ágar (Figura 14). Os espectros revelam picos em 5,27 e 5,12 ppm que foram atribuídos aos prótons anoméricos da gactose-6-sulfato (L-6S) e 3,6 α -L-anidrogactose (LA), respectivamente. Além disso, o H-1 da β -D-gactose (G) que está ligado a 3,6 α -L-anidrogactose foi revelado pelo pico em 4,54 ppm (ANDRIAMANANTOANINA; CHAMBAT; RINAUDO, 2007; MACIEL et al., 2008). Ademais, o sinal do H-3 da gactose-6-sulfato (L-6S) foi observado em 3,75 ppm (MAZUMDER et al., 2002).

O espectro de ^1H mostrou um padrão de metilação com um sinal evidente em 3,41 ppm que é atribuído ao próton do grupamento metil ligado a C-6 de β -D-gactose (G6M). Este achado já foi descrito para gactanas obtidos de algumas espécies de algas vermelhas (FURNEAUX; MILLER; STEVENSON, 1990; VILLANUEVA; MONTANO, 1999; BARROS et al., 2013).

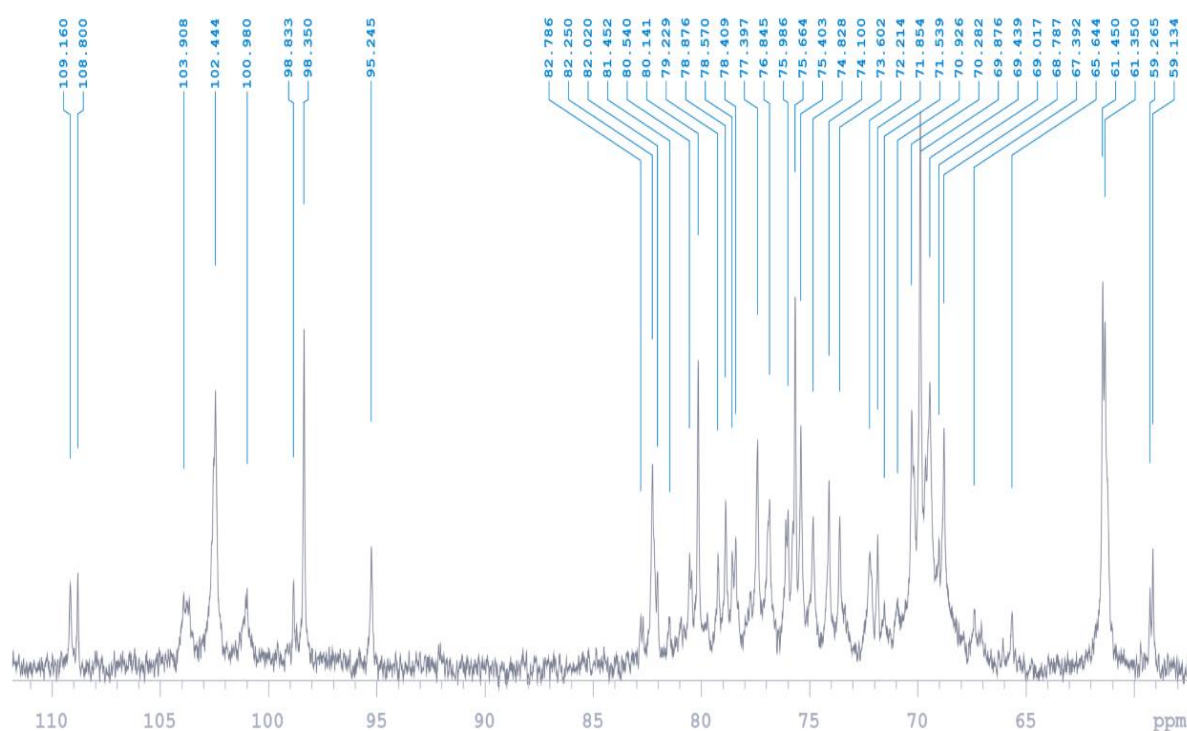
Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa*.



O pequeno sinal em 1,45 ppm é representativo de próton metílico do acetal de ácido pirúvico ligado nas posições C4 e C6 de β -D-galactose (LAHAYE; ROCHAS; YAPHE, 1986). Em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa com a espécie *Gracilaria caudata* o pico que representa esse grupamento era mais evidente, revelando a presença de uma maior quantidade do substituinte ácido pirúvico (BARROS *et al.*, 2013).

O espectro de RMN de ^{13}C dos polissacarídeos sulfatados *G. acerosa* está representado na Figura 15. O espectro de ^{13}C confirmou um padrão típico de ágar com 12 sinais relacionados aos carbonos oriundos da agarose (FREILE-PELEGRÍN; MURANO, 2005; USOV; YAROTSKY; SHASHKOV, 1980). Os sinais em 102,4; 70,2; 82,2; 68,7; 75,4 e 61,4 ppm correspondem aos carbonos (1-6) da unidade β -D-galactose (G), enquanto os sinais em 98,3; 69,8; 80,1; 77,3; 75,5 e 69,4 ppm correspondem aos carbonos (1-6) da unidade 3,6- α -L-anidrogactose (LA).

Figura 15 - Espectro de RMN de ^{13}C dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa*.

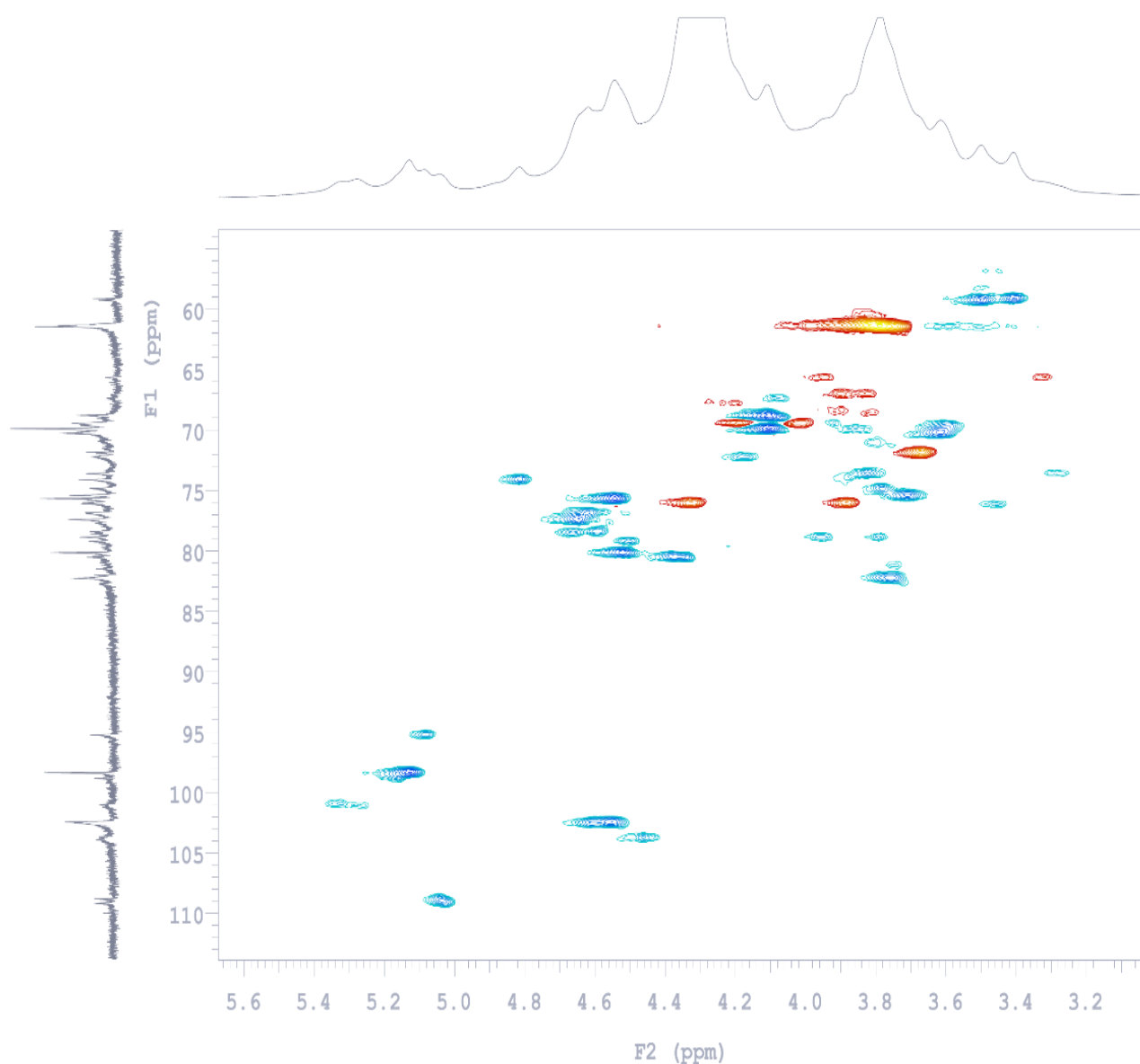


Além dos sinais já citados, o espectro de ^{13}C revelou sinais em 69, 73,6 e 71,8 ppm que foi atribuído ao carbono a C-4, C-5 e C-6 dos resíduos de β -D-galactose-6-O-metil (BARROS *et al.*, 2013; MILLER; FURNEAUX, 1997; MURANO, 1995). No entanto, não foi observado sinal referente a resíduos de 4-O-metil- α -L-galactose em 61,7 ppm obtidos para os polissacarídeos sulfatados isolados de *Gracilaria cervicornis* (BIRD *et al.*, 1987), demonstrando a ausência desse grupamento na estrutura química dos polissacarídeos de *Gelidiella acerosa*.

O sinal em 59,1 ppm corresponde ao grupamento metil ligado a C-6 de β -D-galactose (G6M) (MILLER & FURNEAUX, 1997; USOV; YAROTSKY; SHASHKOV, 1980), corroborando com os dados de metilação evidenciados no espectro de ^1H dos polissacarídeos de *G. acerosa* obtidos nesse estudo.

O espectro de HSQC do ^1H e ^{13}C dos polissacarídeos de *Gelidiella acerosa* estão mostrados na figura 16. O HSQC permite uma correlação entre os grupamentos químicos da molécula, relacionando os carbonos aos seus respectivos prótons, como exposto na tabela 3.

Figura 16 – Espectro de HSQC dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa*.



De acordo com os dados obtidos através dos espectros de RMN e dados da literatura, podemos concluir que os PSGa são polissacarídeos sulfatados do tipo ágar, formados principalmente por repetições dos resíduos de (1→3) β-D-galactopiranosose e α (1 → 4) - 3,6-anidro-α-L-galactose, com substituições desses monossacarídeos por β-D-galactopiranosose-6-metil (G-6M), e α-L- galactose-6-sulfato (L-6S), além de apresentarem substituições por acetal de ácido pirúvico em sua unidade de β-D-galactopiranosose.

Tabela 3 - Assinalamentos de RMN de ^1H e ^{13}C para os polissacarídeos sulfatados de *G. acerosa*.

Resíduo ^a	¹ H Deslocamento químico (ppm)						
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	O-Me
β-D-galactose (G)	4,5	3,6	3,7	4,1	b	3,7	-
3,6 α-L-anidrogalactose (LA)	5,1	4,1	4,5	b	4,5	4,1	-
Galactose-6 sulfato (L-6S)	5,2	b	b	b	b	b	-
β-D-galactose-6-O-metil (G6M)	b	b	b	b	b	b	3,4

Resíduo ^a	¹³ C Deslocamento químico (ppm)						
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	O-Me
β-D-galactose (G)	102,4	70,2	82,2	68,7	75,4	61,4	-
3,6 α-L-anidrogalactose (LA)	98,3	69,8	80,1	77,3	75,6	69,4	-
Galactose-6 sulfato (L-6S)	100,9	b	b	78,8	b	b	-
β-D-galactose-6-O-metil (G6M)	b	b	b	69	73,6	71,8	59,1

^a Nomenclatura proposta por Knutsen *et al.* (1994).

^b Esse sinal pode ter sido sobreposto por sinais de unidades não substituídas.

5.3 Atividade anticoagulante e antiagregante plaquetária *in vitro*

5.3.1 Tempo de tromboplastina parcialmente ativada

A atividade anticoagulante pode ser determinada por ensaios funcionais específicos que analisam e monitoram a formação do coágulo sanguíneo (LEADLEY *et al.*, 2000). O teste do tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPA) baseia-se na ativação do mecanismo intrínseco da coagulação sanguínea. A cefalina utilizada neste teste atua como um substituto plaquetário, sendo também necessário a adição de cálcio ao plasma a ser testado para a ativação da cascata (BOURIN; LINDAHL, 1993).

O tempo de coagulação sanguínea para o teste do TTPA após a adição dos PSGa nas concentrações de 0,01, 0,1, 0,5, 0,75, 1 e 2 mg/mL foi respectivamente, de 1,01 (34,4 ± 0,05 s), 1,05 (35,6 ± 0,03 s), 1,1 (37,2 ± 0,7 s), 1,3 (44,3 ± 2,2 s), 2,1 (70,3 ± 0,3 s) e 1,9 (63,1 ± 2,4 s) vezes, prolongando o tempo de coagulação sanguínea em no máximo 2,1 vezes, na concentração de 1 mg/mL, em relação ao

plasma controle ($33,0 \pm 0,05$ s) (Tabela 2). Em um trabalho anterior, uma fração polissacarídica isolada de *G. acerosa*, foi purificada por cromatografia de DEAE-celulose e foi capaz de prolongar o tempo de coagulação no teste TTPA em 71,1 s (QUEIROZ *et al.*, 2014), apresentando potencial semelhante aos PSGa, demonstrando que não era necessário realizar um passo seguinte de purificação para obter a mesma atividade.

Tabela 4 – Atividade anticoagulante dos polissacarídeos de *Gelidiella acerosa* avaliada pelo teste do TTPA.

Polissacarídeo	Concentração (mg/mL)	TTPA (s)	T ₁ /T ₀ ^a
PSGa	0,01	34,4 ± 0,05	1,01
	0,10	35,6 ± 0,03	1,05
	0,50	37,2 ± 0,70	1,10
	1,00	70,3 ± 0,30*	2,10
	2,00	63,1 ± 2,40*	1,90
Heparina 156 UI	0,10	50,0 ± 13,0	1,47
	0,50	80,0 ± 11,6*	2,36
	1,00	141,3 ± 7,1*	4,16
	2,00	>300*	-

Os dados foram representados em segundos (s) como média ± EPM (n=3) e analisados por ANOVA e teste de Bonferroni (*p<0,05). Os resultados foram comparados ao plasma na ausência dos PSGa e heparina (33,9 s). ^aT₁/T₀: Tempo de coagulação do plasma na presença (T₁) e ausência (T₀) dos PSGa ou heparina.

Potencial anticoagulante semelhante aos obtidos para os PSGa foram observados para os polissacarídeos sulfatados isolados da alga marinha *Enteromorpha linza*, com DS de 0,46. Esses polissacarídeos sulfatados foram capazes de prolongar o tempo de coagulação em duas vezes, na maior concentração testada (100 µg/mL), sendo que após a sulfatação química da molécula, a mesma

adquiriu um DS de 0,90, e atividade anticoagulante foi melhorada em 2 vezes, apresentando o dobro da atividade no teste de TTPA (WANG *et al.*, 2013).

Estudos que envolvem a adição de grupamentos sulfatos a polissacarídeos sulfatados confirmam a importância do DS elevado para a obtenção do efeito anticoagulante. No entanto, apesar da modificação química da molécula ser uma forma de aumentar o potencial anticoagulante, vários estudos com polissacarídeos sulfatados nativos de algas marinhas vermelhas têm sido descritos na literatura e mostram resultados satisfatórios (PEREIRA *et al.*, 2005; PEREIRA; MELO; MOURÃO, 2002; TANG *et al.*, 2017).

5.3.2 Tempo de protrombina

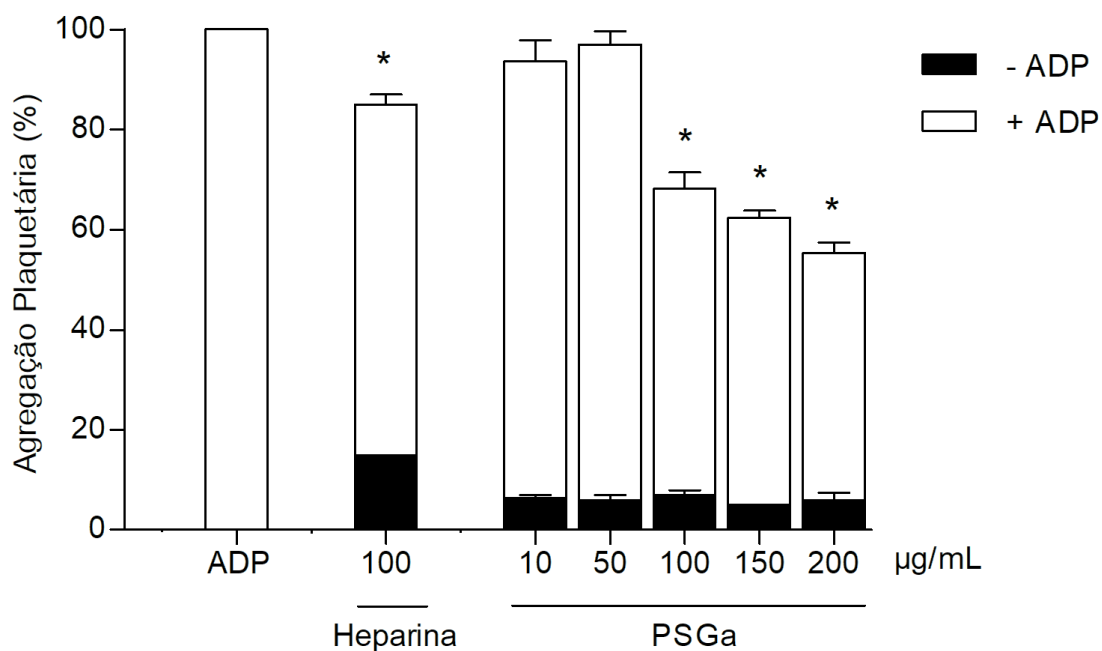
O teste do tempo de protrombina (TP) investiga o sistema extrínseco da coagulação, permitindo revelar deficiências dos fatores que fazem parte deste sistema (JIN; GOPINATH, 2016). Os PSGa não apresentaram efeito sobre o teste de TP, mostrando que não apresentam ação sobre o sistema extrínseco de coagulação. Do mesmo modo que os polissacarídeos sulfatados isolados de *G. acerosa*, os polissacarídeos sulfatados isolados de diferentes espécies de algas marinhas vermelhas apresentaram efeito no teste de TTPA, mas não apresentam potencial anticoagulante evidenciados no teste de TP (LI *et al.*, 2017; WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011). Diante disso, é evidente a ação seletiva dos PSGa sobre a via intrínseca da cascata de coagulação.

5.3.3 Agregação plaquetária

O ADP é conhecido por promover a agregação plaquetária através da exposição de locais de ligação ao fibrinogênio (COLMAN, 2006). Os resultados mostraram que os PSGa nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ não apresentaram efeitos significativos sobre a inibição da agregação plaquetária induzida por ADP. Contudo, os PSGa nas três maiores concentrações (100, 150 e 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) inibiram a agregação plaquetária em 32%, 38% e 45%, respectivamente. Ao contrário dos polissacarídeos obtidos na maioria das algas marinhas, os PSGa não promoveram a agregação plaquetária *per se* e mostraram um efeito significativo, inibindo a agregação plaquetária induzida por ADP (Figura 17). Enquanto isso, a heparina

apresentou uma baixa inibição sobre a agregação plaquetária (15%). Isso confirma que a heparina apesar de apresentar alto efeito anticoagulante, não age a nível de inibição da agregação plaquetária, justificando a necessidade de busca de novas moléculas capazes de atuar sobre essa via.

Figura 17 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa* sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.



A agregação plaquetária foi expressa como aumento da transmitância por 5 min. Os dados foram representados em porcentagem (%) como média \pm EPM (n=3), analisados por ANOVA e teste de Bonferroni (*p<0,05). Os resultados foram comparados ao plasma na ausência (100% T) e presença dos PSGa (10, 50, 100, 150 e 200 e $\mu\text{m}/\text{mL}$) e heparina (100 $\mu\text{m}/\text{mL}$).

Galactanas sulfatadas de equinodermos são conhecidas por apresentarem forte potencial de inibição da agregação plaquetária (MOURÃO; PEREIRA, 2000). No entanto, o efeito como antiagregante de plaquetas para polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas é pouco descrito na literatura. Um dos poucos estudos com polissacarídeos sulfatados do tipo carragenana isolados da alga vermelha *Tichocarpus crinitus* exibiram atividade antiplaquetária de 55 % na concentração de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, utilizando como agente agregante o colágeno (BYANKINA *et al.*, 2013).

Muitos trabalhos descreveram o potencial de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas em promover a agregação plaquetária *per se*, como evidenciado para

os polissacarídeos sulfatados das espécies *Fucus vesiculosus* (DE AZEVEDO *et al.*, 2009), *Codium fragile* e *Codium vermilara* (CIANCIA *et al.*, 2007). Diante disso, os polissacarídeos sulfatados obtidos de *G. acerosa* surgem como uma alternativa, pois apresentam considerável efeito sobre a agregação plaquetária induzida por ADP. Esse resultado mostra a importância na busca de nossas moléculas que apresentem ação sobre diferentes alvos do processo de coagulação sanguínea, surgindo como alternativas para futuras aplicações na área biomédica.

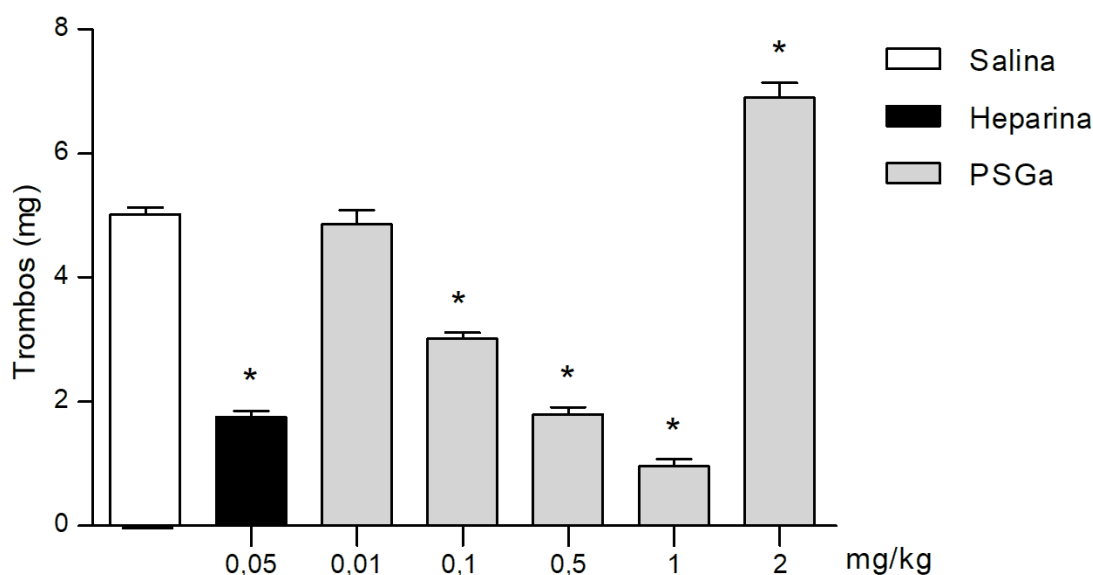
5.4 Atividade anticoagulante *in vivo*

5.4.1 Trombose venosa

Os polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa* inibiram a formação de trombo induzida por tromboplastina em ratas. Os animais tratados com solução salina tiveram um peso médio de trombo de $5,02 \pm 0,6$ mg e foram considerados como 100 % de atividade trombótica. Os PSGa apresentaram forte potencial antitrombótico e reduziram a formação de trombo nas doses 0,1 mg/kg (40%), 0,5 mg/kg (64%) e 1 mg/kg (80%), mas na última dose testada (2 mg/kg) apresentou atividade protrombótica, aumentando o tamanho dos trombos em 37% (figura 18).

Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas em altas doses podem produzir um efeito oposto, promovendo estímulos protrombóticos através do mecanismo de indução da agregação plaquetária (POMIN, 2016). Resultados semelhantes foram observados para polissacarídeos sulfatados obtidos a partir da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*, que apresentaram atividade antitrombótica em doses inferiores a 0,5, mas em doses mais elevadas apresentaram efeito protrombótico (FONSECA *et al.*, 2008).

Figura 18 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa* sobre a trombose venosa induzida por tromboplastina.



O peso dos trombos foi representado em miligramas (mg) como média \pm EPM (n=6), analisados por ANOVA e teste de Bonferroni (* $p < 0,05$). Os resultados foram comparados com os trombos após a administração de salina ($5,02 \pm 0,6$) em relação aos PSGa (0,01, 0,1, 0,5, 1 e 2 mg/kg) e heparina (0,05 mg/kg).

Além disso, é sabido que o potencial antitrombótico das galactanas sulfatadas está intimamente relacionado com as características químicas da molécula, mas apesar dos avanços crescentes, seu mecanismo de ação ainda não está claro (QUINDERÉ *et al.*, 2014). No entanto, a atividade antitrombótica parece ser conectada à estrutura química peculiar das galactanas sulfatadas, sendo mais evidenciada para moléculas que possuem considerável grau de sulfatação e contêm 3,6-anidrogactose na cadeia polimérica (BYANKINA *et al.*, 2013).

5.4.2 Tendência hemorrágica

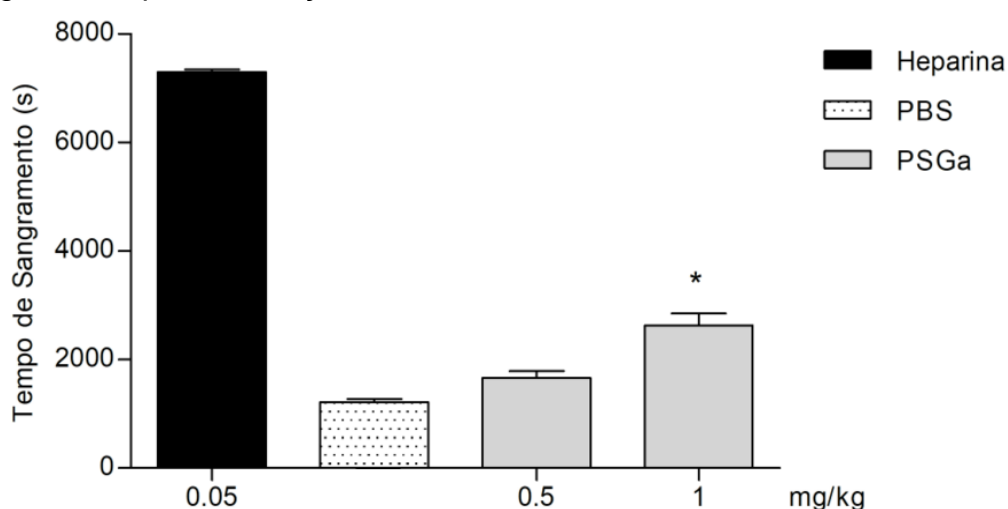
Os medicamentos anticoagulantes que geralmente são utilizados na clínica, principalmente a heparina e seus derivados, apresentam muitas desvantagens, incluindo complicações relacionadas ao aumento do tempo de sangramento, causando acidentes hemorrágicos (MENAJOVSKY, 2005). Portanto, é fundamental avaliar a tendência hemorrágica de moléculas que são utilizadas visando uma aplicação sobre a coagulação sanguínea.

Para verificar se os polissacarídeos sulfatados de *G. acerosa* apresentavam potencial hemorrágico foi realizado o teste de tempo de sangramento.

Para isso, as doses com o melhor efeito antitrombótico foram selecionadas para avaliação da tendência de hemorragia. Nos animais que foram administrados o controle negativo (PBS), foi registrado o tempo de sangramento de 1215 s e foi considerado o tempo de sangramento normal. Em contraste, o controle positivo (heparina) na dose de 0,05 mg/kg, aumentou o tempo de sangramento em mais de 6 vezes em relação ao PBS (7300 s), evidenciando o potencial hemorrágico da heparina, sendo essa umas das desvantagens do seu uso (KAKKAR; HOWES; SHARMA, 2000).

Os PSGa não aumentaram o tempo de sangramento na dose de 0,5 mg/kg, apresentando o mesmo efeito que o PBS. Já na dose de 1 mg/kg, aumentou o tempo de sangramento em apenas 2,1 vezes (2627 s) quando comparado ao controle negativo. De acordo com os dados obtidos, os PSGa apresentam potencial antitrombótico livre de efeitos hemorrágicos (Figura 19).

Figura 19 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa* sobre o tempo de sangramento por transecção da cauda.



O tempo de sangramento foi representado em segundos (s) como média \pm EPM (n=6), analisados por ANOVA e teste de Bonferroni (* $p < 0,05$). Os resultados foram comparados com o tempo de sangramento após administração do PBS (1215 s) em relação aos PSGa (0,5 e 1 mg/kg) e heparina (0,05 mg/kg).

Esses resultados sugerem um possível modo de ação dos PSGa, que como evidenciado nos resultados obtidos, apresentaram efeito moderado a nível de cascata de coagulação, não promovendo distúrbios hemorrágicos. No entanto, os PSGa apresentaram atividade inibitória a nível de agregação plaquetária e como antitrombótico, mostrando que os polissacarídeos sulfatados de *G. acerosa*

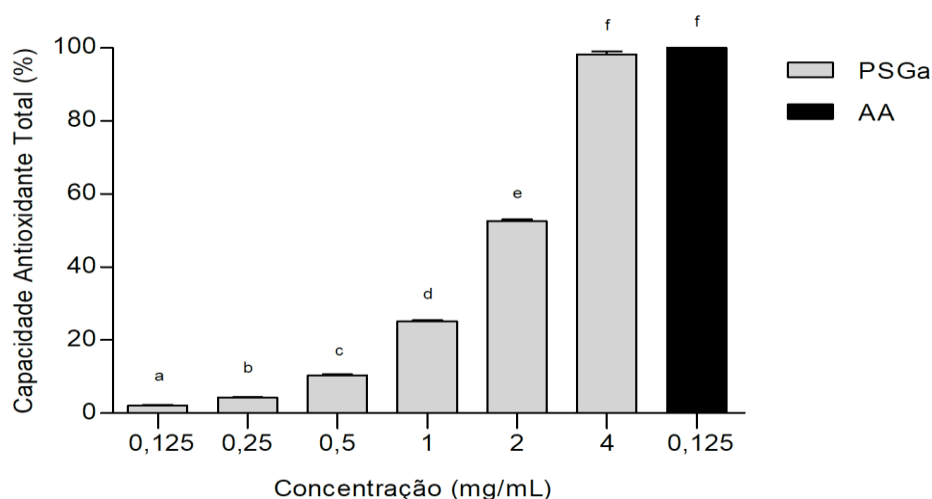
apresentam um alto poder antitrombótico, agindo principalmente sobre as plaquetas, sendo necessário mais estudos para esclarecer o mecanismo de ação.

5.5 Atividade antioxidante

5.5.1 Capacidade antioxidante total

A avaliação da capacidade antioxidante total através da redução do complexo de fosfomolibdênio ($\text{Mo}^{6+} \rightarrow \text{Mo}^{5+}$) é um método eficiente para indicar a propensão ao dano oxidativo (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Os PSGa mostraram forte potencial no teste, apresentando efeito de redução do complexo de fosfomolibdênio dependente da concentração (0,125-4 mg/mL), com uma atividade antioxidante total na faixa de 2,05-98,26%. Na concentração máxima testada (4 mg/mL), os PSGa mostraram efeito semelhante ao ácido ascórbico (Figura 20).

Figura 20 – Efeito dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa* sobre o teste de capacidade antioxidante total.



Os resultados são expressos em porcentagem (%) como média \pm S.E.M. (n = 3), analisados por ANOVA e teste de Bonferroni (* $p < 0,05$). As diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações. Os resultados dos PSGa (0,125-4 mg/mL) foram comparados com o AA (0,125 mg/mL).

A atividade antioxidante total dos PSGa foi maior do que os polissacarídeos sulfatados obtidos da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (62,4%) na mesma

concentração (SOUSA *et al.*, 2016). Além disso, em um estudo realizado por Castro *et al.* (2013), os polissacarídeos sulfatados isolados da alga marrom *Lobophora variegata* apresentaram atividade antioxidante total de 66,3%, utilizando uma concentração de 10 mg/kg que é 2,5 vezes maior do que a concentração utilizada nesse estudo (4 mg/mL), que apresentou um alto potencial de 98,26% de capacidade antioxidante total.

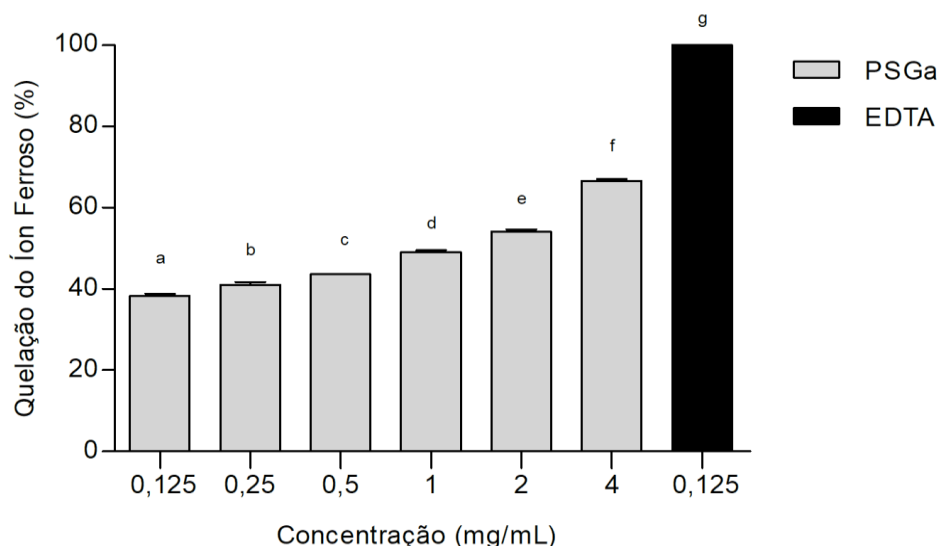
Em um estudo realizado por Yang *et al.* (2011), foi comparado o potencial antioxidante dos polissacarídeos sulfatados nativos e desulfatados da alga vermelha *Corallina officinalis*. Os resultados mostraram que os polissacarídeos sulfatados nativos possuíam melhor atividade antioxidante frente a testes de eliminação e redução de radicais livres, quando comparado aos derivados que tiveram os grupamentos sulfatos retirados da molécula. Diante disso, é notória a importância dos grupamentos sulfatos para a atividade antioxidante total, possibilitando justificar o potencial antioxidante dos polissacarídeos de *G. acerosa*, pois um considerável teor de sulfato foi observado por microanálise, somado aos espectros obtidos por FTIR e RMN que revelaram a presença desses grupamentos químicos na estrutura dos PSGa.

5.5.2 Quelação do íon ferroso

A avaliação do potencial de quelação de íons ferrosos é um parâmetro importante a ser investigado, devido à alta capacidade reativa de Fe^{2+} , que pode levar à peroxidação lipídica (LIU *et al.*, 2012). Além disso, este metal promove mudanças fisiológicas e bioquímicas, pois interage negativamente com lipídios, proteínas e outros componentes celulares (SMITH; HALLIWELL; ARUOMA, 1992). Portanto, é de suma importância a busca por compostos quelantes que realizem a captura íons metálicos presentes no meio, impossibilitando que os mesmos, quando livres, promovam danos celulares.

Os PSGa mostraram alta capacidade de quelação do íon ferroso de forma concentração-dependente (0,125-4 mg/mL/38,38-66,65%). Na menor concentração testada os PSGa exibiram um potencial de quelação de 38,38%. Na maior concentração testada os PSGa mostraram um considerável potencial antioxidante de 66,65% (Figura 21).

Figura 21 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa* sobre o teste de quelação do íon ferroso.



Os resultados são expressos em porcentagem (%) como média \pm S.E.M. ($n = 3$), analisados por ANOVA e teste de Bonferroni ($*p < 0,05$). As diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações. Os resultados dos PSGa (0,125-4 mg/mL) foram comparados com o EDTA (0,125 mg/mL).

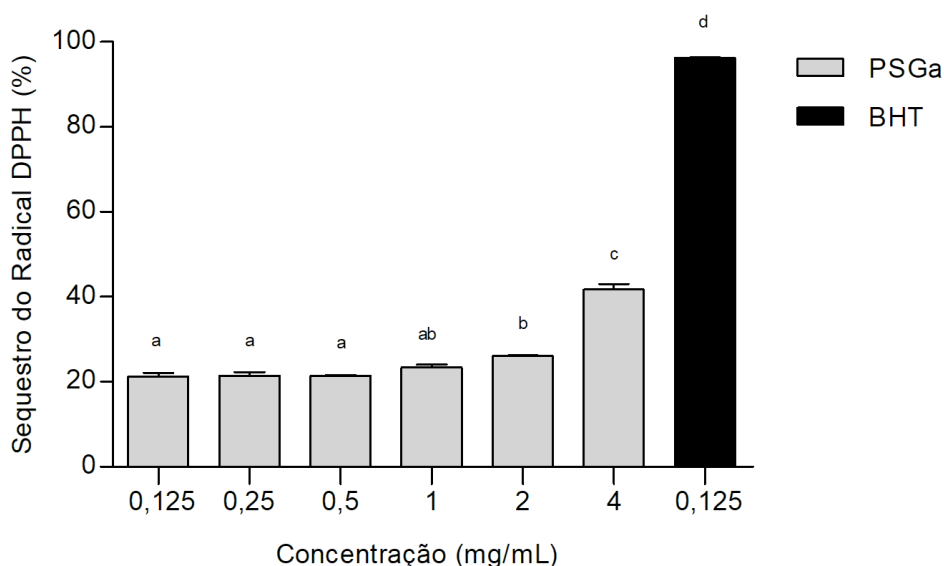
O potencial de quelação de íon ferroso obtido nesse estudo para os polissacarídeos sulfatados de *G. acerosa*, foi semelhante ao observado para os polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata*, que apresentou uma atividade antioxidante sobre o íon ferroso de 69,8% na mesma concentração de 4 mg/mL, mesmo os polissacarídeos apresentando um DS de apenas 0,14 (ALENCAR, 2016).

Nossos resultados corroboram com o fato de que os polissacarídeos têm potencial antioxidante sobre íons de ferro e cobre, atuando através do mecanismo de inibição da geração de radicais livres (WANG *et al*, 2016). Além disso, os compostos contendo na sua estrutura mais de um dos seguintes grupos funcionais: -OH, -SH, -COOH, -PO₃H₂, -C = O, -NR₂, -S- e -O-, são moléculas com potencial promissor sobre quelação de íon ferroso (GÜLÇİN, 2016). A caracterização química e estrutural dos PSGa confirmou a presença de alguns dos grupos funcionais, acima mencionados, no esqueleto químico dos polissacarídeos sulfatados obtidos de *G. acerosa*, justificando seu considerável poder em quelar íon ferroso.

5.5.3 Sequestro do radical DPPH

A atividade de eliminação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo-hidrato (DPPH), baseia-se no fato deste ser um radical livre que pode aceitar hidrogênios ou elétrons garantindo a estabilidade química (LI; SHAH, 2014). Os PSGa foram testados nas mesmas concentrações dos testes anteriores (0,125-4 mg/mL) e apresentaram potencial antioxidante que variou entre 21,32 e 41,74%, mas nenhuma das concentrações testadas mostrou alta atividade semelhante ao controle positivo (BHT) (figura 22).

Figura 22 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa* sobre o teste de sequestro do radical DPPH.



Os resultados são expressos em porcentagem (%) como média \pm S.E.M. (n = 3), analisados por ANOVA e teste de Bonferroni (* $p < 0,05$). As diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações. Os resultados dos PSGa (0,125-4 mg/mL) foram comparados com o BHT (0,125 mg/mL).

Resultados semelhantes foram observados para diferentes frações de polissacarídeos obtidas da alga marinha vermelha *Gracilaria rubra*, que apresentou potencial antioxidante sobre o radical DPPH entre 22,84 a 41,59%, em concentrações que variaram entre 0,125 e 2,5 mg/mL (DI *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado por Ganesan; Kumar e Rao (2011), frações polissacarídicas da alga marinha vermelha *Pterocladia capilácea* foram enzimaticamente hidrolisadas e após o processo de quebra parcial das cadeias

poliméricas, a atividade antioxidante de eliminação dos radicais DPPH foi melhorada em mais de 50%, isso pode ser atribuído à presença de compostos bioativos que atuam como redutores ou doadores de elétrons que eliminam o radical livre. Essa atividade possivelmente foi melhorada devido ao menor comprimento de cadeia dos hidrolisados, levando a uma maior exposição de seus grupos químicos (FLEITA; EL-SAYED; RIFAAT, 2015).

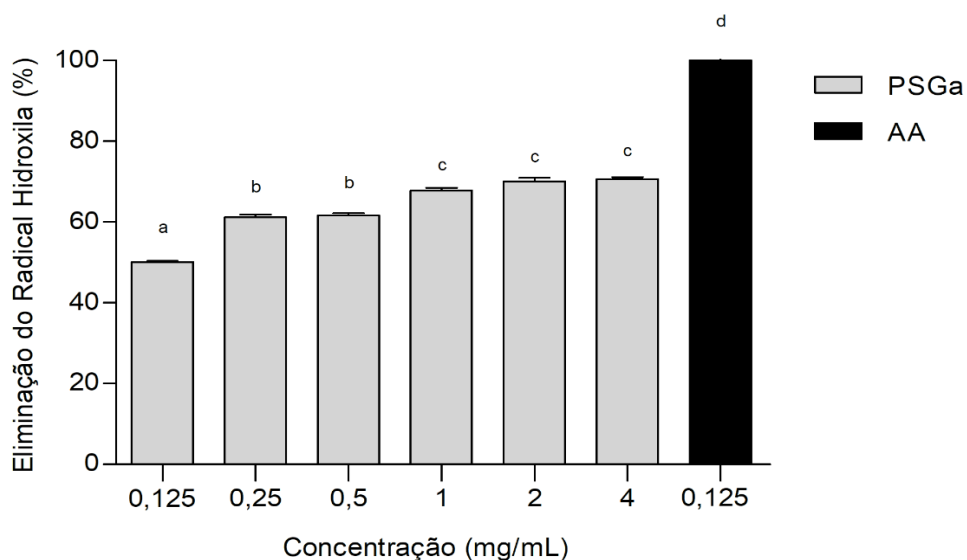
Estudos indicaram que a ação de um antioxidante com o DPPH depende de sua conformação estrutural e do número de grupos hidroxílicos disponíveis. Diante disso, acredita-se que o efeito inibitório contra este radical esteja relacionado à estrutura química dos polissacarídeos sulfatados que apresentam hidroxilas livres, favorecendo assim a abstração dos átomos de hidrogênio (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

O resultado mediano obtido sobre o teste de sequestro do radical DPPH, pode ser devido ao grande peso e tamanho das moléculas dos PSGa que foram confirmados por GPC, pois moléculas grandes tem maior dificuldade de exposição de seus grupamentos, quando comparado a uma maior quantidade de moléculas pequenas, resultante do processo de hidrólise parcial.

5.5.4 Eliminação do radical hidroxila

O radical hidroxila é um poderoso radical livre que pode interagir fortemente com um grande número de moléculas funcionais, promovendo dano celular severo (SEEDEVI *et al.*, 2017). Os PSGa (0,125-4 mg/mL) mostraram atividade variando de 50,13-70,65%. Na concentração mais baixa testada, os PSGa, mostraram um potencial de prevenção de oxidação superior a 50%, demonstrando a eficácia dos polissacarídeos sulfatados de *G. acerosa* como um antioxidante de origem natural e sem modificação química (Figura 23).

Figura 23 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados de *Gelidiella acerosa* sobre o teste de eliminação do radical hidroxila.



Os resultados são expressos em porcentagem (%) como média \pm S.E.M. ($n = 3$), analisados por ANOVA e teste de Bonferroni ($*p < 0,05$). As diferentes letras acima das barras indicam diferenças significativas entre as concentrações. Os resultados dos PSGa (0,125-4 mg/mL) foram comparados com o AA (0,125 mg/mL).

Em trabalhos anteriores foi mostrado que a atividade antioxidante sobre o radical hidroxila é significativamente aumentada com o aumento do DS (WANG *et al.*, 2016). Diante disso, pode ser sugerido que polissacarídeos de *G. acerosa* apresentaram alto potencial antioxidante contra o radical hidroxila, devido ao considerável grau de sulfatação revelado por microanálise.

De modo geral, dentre as várias moléculas antioxidativas que já foram estudadas, os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas eliminam efetivamente radicais livres, promovem a quelação de íons metálicos para inibir a produção contínua de radicais e protegem contra a peroxidação lipídica, confirmando o potencial biológico dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas como moléculas antioxidantes (WANG *et al.*, 2016).

6 CONCLUSÃO

Os polissacarídeos sulfatados obtidos de *G. acerosa* mostraram alto grau de pureza e teor de carboidratos de 89,5%, demonstrando a eficiência do método de extração enzimática, que mostrou considerável rendimento (7,1%). Além disso, os PSGa revelaram significativo teor de sulfato e uma massa molar média de 284,8 kDa. Os espectros de FTIR e RMN mostraram que os PSGa como sendo uma galactana sulfatada do tipo agarana.

Os PSGa apresentaram efeito anticoagulante sobre a via intrínseca e/ou comum da coagulação, mas não pela via extrínseca. Além disso, mostraram possuir potencial antiagregante plaquetário e específico para a dissolução de trombos sem apresentar efeito hemorrágico, podendo o potencial antioxidante ter contribuído para seu efeito antitrombótico. Diante disso, esses resultados colocam os polissacarídeos de *G. acerosa* como moléculas potenciais visando futuras aplicações na indústria farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- AKBARY, P.; AMINIKHOEI, Z. Effect of water-soluble polysaccharide extract from the green alga *Ulva rigida* on growth performance, antioxidant enzyme activity, and immune stimulation of grey mullet *Mugil cephalus*. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], p. 1-9, 2017.
- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate polymers**, [s.l.], v. 97, n. 2, p. 253-261, 2013.
- ALENCAR, P. O. C. **Polissacarídeos obtidos da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* j. agardh: estudo químico-estrutural e avaliação de atividade antioxidante**. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2016.
- ANAND, J.; SATHUVAN, M.; BABU, G. V.; SAKTHIVEL, M.; PALANI, P.; NAGARAJ, S. Bioactive potential and composition analysis of sulfated polysaccharide from *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgeson. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], 2018.
- ANDRADE, L. R. et al. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. **Marine pollution bulletin**, [s.l.], v. 60, n. 9, p. 1482-1488, 2010.
- ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research**, [s.l.], v.114, p. 447-453, 2004.
- ANDRIAMANANTOANINA, H.; CHAMBAT, G.; RINAUDO, M. Fractionation of extracted Madagascan *Gracilaria corticata* polysaccharides: Structure and properties. **Carbohydrate polymers**, [s.l.], v. 68, n. 1, p. 77-88, 2007.
- AQUINO, R.S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A.M.; VALENTE, A.P.; ANDRADE, L.R.; MOURÃO, P.A.S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, [s.l.], v.15, n.1, p 11-20, 2005.
- ARAD, S. M; LEVY-ONTMAN, O. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. **Current opinion in biotechnology**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 358-364, 2010.
- ARAÚJO, I. W. F.; CHAVES, H. V.; PACHÊCO, J. M.; VAL, D. R.; VIEIRA, L. V., SANTOS, R.; FREIRAS, R. S.; RIVANOR R.L.; MONTEIRO V. S.; CLEMENTE-JAPIMOGA J. T.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES N. M. B. Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria filiformis* in induced temporomandibular joint pain. **International immunopharmacology**, [s.l.], v. 44, p. 160-167, 2017.
- ARFORS, K. E.; LEY, K. Sulfated polysaccharides in inflammation. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, [s.l.], v. 121, n. 2, p. 201-202, 1993.

ARMISEN, R.; GALATAS, F. Production, properties and uses of agar. **Production and utilization of products from commercial seaweeds. FAO Fish. Tech. Pap.**, [s.l.], v. 288, p. 1-57, 1987.

AZEVEDO, T.C.G. **Ação de polissacarídeos sulfatados de *Fucus vesiculosus* na hemostasia e no sistema complemento.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Natal, RN, 2006.

BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**, 2ª ed. Manole, São Paulo, 1991.

BARROS, F. C. N.; SILVA, D. C.; SOMBRA, V. G.; MACIEL, J. S.; FEITOSA, J. P. A.; FREITAS, A. L. P.; DE PAULA, R. C. M. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh), **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 92, p. 598– 603, 2013.

BAUER, K. A. New oral anticoagulants in development: potential for improved safety profiles. **Reviews in neurological diseases**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 1-8, 2010.

BERTASA, M.; BOTTEON, A.; BRAMBILLA, L.; RIEDO, C.; CHIANTORE, O.; POLI, T.; SCALARONI, D. Cleaning materials: A compositional multi-analytical characterization of commercial agar powders. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [s.l.], v. 125, p. 310-317, 2017.

BIRD, C. J.; HELLEUR, R. J.; HAYES, E. R.; MCLACHLAN, J. Analytical pyrolysis as a taxonomic tool *in Gracilaria* (Rhodophyta: Gigartinales). **International Seaweed Symposium**, [s.l.], v. 12, p. 207-212, 1987.

BHATT, DL. **Platelets in cardiovascular disease**, 1st edn. London: Imperial College Press, 2008.

BITHELL, T. C. **Blood coagulation.** In LEE, G. R.; BITHEL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. Wintrobe's Clinical Hematology. 9. ed. v. 1. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

BLANN, A. D. Platelets: The universal killer?. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, [s.l.], v. 1772, n. 7, p. 715-717, 2007.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, [s.l.], v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BORN, G. V. R.; CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **The Journal of physiology**, [s.l.], v. 168, p. 178-195, 1963.

BOURIN, M. C.; LINDAHL, U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 289, n. Pt 2, p. 313, 1993.

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**, [s.l], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, [s.l], v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. **Ministério da Saúde**, Rede Interagencial de Informação para a Saúde, DataSUS. População Residente: notas técnicas. DATASUS; 2010.

BRITO T.V; PRUDÊNCIO R.S; SALES A.B; JÚNIOR F.C.V; CANDEIRA S.J.N; FRANCO A.X. Anti-inflammatory effect of sulfated-polysaccharide fraction of extracted from red Algae *Hypnea musciformis* via the suppression neutrophil migration by NO signaling pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s.l], v. 65, p. 724–733. 2013.

BRITO, T. V.; NETO, J. P.; PRUDÊNCIO, R. S.; BATISTA, J. A.; JÚNIOR, J. S.; SILVA, R. O.; FRANCO A. X.; ARAGÃO K. S.; SOARES P. M. G.; SOUZA M. H. P.; CHAVES, L. S.; FREITAS A. L. P.; MEDEIROS J. V. R.; BARBOSA A. L. R. Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s.l], v. 66, n. 8, p. 1161-1170, 2014.

BURG, A.; OSHRAT, L. Salt Effect on the Antioxidant Activity of Red Microalgal Sulfated Polysaccharides in Soy-Bean Formula. **Marine drugs**, [s.l], v. 13, n. 10, p. 6425-6439, 2015.

BYANKINA, A. O.; SOKOLOVA, E. V.; ANASTYUK, S. D.; ISAKOV, V. V.; GLAZUNOV, V. P.; VOLOD'KO, A. V.; YACOVLEVA, I. M.; SOLOVEVA, T. F.; YERMAK, I. M. Polysaccharide structure of tetrasporic red seaweed *Tichocarpus crinitus*. **Carbohydrate polymers**, [s.l], v. 98, n. 1, p. 26-35, 2013.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and chemical toxicology**, [s.l], v. 51, p. 15-25, 2013.

CASTRO, H. C.; Ferreira, B. L. A.; Nagashima, T.; Schueler, A., Rueff, C.; Camisasca, D.; Filgueira, M. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **J Bras Patol Med Lab**, [s.l], v. 42, n. 5, p. 321-32, 2006.

CASTRO, L. S. E. W.; PINHEIRO, T. S.; CASTRO, A. J.; DORE, C. M.; DA SILVA, N. B.; ALVES, M. G. D. C. F.; SANTOS, M. S. N.; LEITE, E. L. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown macroalgae *Lobophora variegata* with antioxidant, anti-inflammatory, and antitumoral effects. **Journal of Applied Phycology**, [s.l], p. 1-8, 2013.

CAUWENBERGS, S.; PAMPUS, E.; CURVERS, J.; AKKERMAN, J.N; HEEMSKERK, J.W. M. Hemostatic and Signaling Functions of Transfused Platelets. **Transfusion Medicine Reviews**. [s.l], v.21(4), p 287-294, 2007.

CHAKRABORTY, K.; JOSEPH, D.; JOY, M.; RAOLA, V. K. Characterization of substituted aryl meroterpenoids from red seaweed *Hypnea musciformis* as potential antioxidants. **Food chemistry**, [s.l], v. 212, p. 778-788, 2016.

CHAVES L.S; NICOLAU, L.A.D; SILVA R.O; BARROS F.C.N; FREITAS A.L.P; ARAGÃO K.S. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudate*. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, [s.l], v. 35, p. 93–100. 2013.

CHEW, Y. L.; LIM, Y. Y.; OMAR, M.; KHOO, K. S. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT-Food Science and Technology**, [s.l], v. 41, n. 6, p. 1067-1072, 2008.

CHOPIN, T.; WHALEN, E. A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. **Carbohydrate Research**, [s.l], v. 246, n. 1, p. 51-59, 1993.

CHRISTIAEN, D.; BODARD, M. Spectroscopie infrarouge de films d 'agar de *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss. **Botanica marina**, [s.l], v. 26, n. 9, p. 425-428, 1983.

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; VIZCARGÜÉNAGA, M. I.; KASULIN, L.; DE DIOS, A.; ESTEVEZ, J. M.; CERESO, A. S. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l], v. 41, n. 5, p. 641-649, 2007.

COHEN, M. The role of low-molecular-weight heparins in arterial diseases: optimizing antithrombotic therapy. **Thromb. Res.**, [s.l], v. 100, v131-v139, 2000.

COLMAN, R. W. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin?. **Journal of Experimental Medicine**, [s.l], v. 203, n. 3, p. 493-495, 2006.

COURA, C. O.; DE ARAÚJO, I. W.; VANDERLEI, E. S.; RODRIGUES, J. A.; QUINDERÉ, A. L.; FONTES, B. P.; QUEIROZ I. N. L.; MENEZES D. B.; BEZERRA M. M.; SILVA A. A. R., CHAVES H. V.; JORGE, R. J.; EVAGELISTA J. S. A. M., BENEVIDES N. M. B. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Sulphated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, [s.l], v. 110, n. 4, p. 335-341, 2012.

CRAIGIE, J. S. **Biology of the Red Algae**. Ed. R.G. SHEATH & K.M. COLE. New York: Cambridge University Press, p. 240, 1990.

CUI-QIN, C. X. X. L.; ZHE-ZHI, W. A. N. G. Study on Extraction and Antioxidation of the Flavonoids from *Anaphalis Sinica* Hance form. *Pterocaula* (Franch. et Savat.) Ling [J]. **Progress in Modern Biomedicine**, [s.l], v. 4, p. 035, 2008.

CUMASHI A; USHAKOVA N.A; PREOBRAZHENSKAYA M.E; D'INCECCO A; PICCOLI A; TOTANI L. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, [s.l.], v. 17, p. 541–552. 2007.

DAHLBÄCK, B. Blood coagulation. **Lancet**, [s.l.], v. 355, p. 1627-1632, 2000.

DE AZEVEDO, T. C. G.; BEZERRA, M. E. B.; SANTOS, M. D. G. D. L.; SOUZA, L. A.; MARQUES, C. T.; BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, E. L. Heparinoids algal and their anticoagulant, hemorrhagic activities and platelet aggregation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 63, n. 7, p. 477-483, 2009.

DE GOTTARDI, A.; TREBICKA, J.; KLINGER, C.; PLESSIER, A.; SEIJO, S.; TERZIROLI, B.; GÖRTZEN, J. Antithrombotic treatment with direct-acting oral anticoagulants in patients with splanchnic vein thrombosis and cirrhosis. **Liver international**, [s.l.], v. 37, n. 5, p. 694-699, 2017.

DE KORT, M.; BUIJSMAN, R. C.; VAN BOECKEL, C. A. A. Synthetic heparin derivatives as new anticoagulant drugs. **Drug discovery today**, [s.l.], v. 10, n. 11, p. 769-779, 2005.

DE REVEL, T.; DOGHMI, K. Physiologie de l'hémostase. **EMC-dentisterie**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 71-81, 2004.

DE SOUZA, L. A. R.; DORE, C. M. P.; CASTRO, A. J.; DE AZEVEDO, T. C.; DE OLIVEIRA, M. T. B.; MARIA DE FÁTIMA, V. M.; BENEVIDES N.M.B.; LEITE, E. L. Galactans from the red seaweed *Amansia multifida* and their effects on inflammation, angiogenesis, coagulation and cell viability. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 154-162, 2012.

DI, T., CHEN, G.; SUN, Y.; OU, S.; ZENG, X.; & YE, H. Antioxidant and immunostimulating activities in vitro of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. **Journal of Functional Foods**, [s.l.], v. 28, p. 64-75, 2017.

EVAN, A. P.; GARDNER, K. D. Nephron obstruction in nordihydroguaiaretic acid-induced renal cystic disease. **Kidney international**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 7-19, 1979.

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 from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FIDELIS, G. P.; CAMARA, R. B. G.; QUEIROZ, M. F.; COSTA, M. S. S. P.; SANTOS, P. C.; ROCHA, H. A. O.; COSTA, L. S. Proteolysis, NaOH and ultrasound-enhanced extraction of anticoagulant and antioxidant sulfated polysaccharides from the edible seaweed, *Gracilaria birdiae*. **Molecules**, [s.l.], v. 19, n. 11, p. 18511-18526, 2014.

FIGUEIREDO, M. A. D. O., HORTA, P. A., PEDRINI, A. D. G., & NUNES, J. M. D. C. Benthic marine algae of the coral reefs of Brazil: a literature review. **Oecologia Australis**, [s.l], v. 12, n. 2, p. 258-269, 2009.

FLEITA, D.; EL-SAYED, M.; RIFAAT, D. Evaluation of the antioxidant activity of enzymatically-hydrolyzed sulfated polysaccharides extracted from red algae; *Pterocladia capillacea*. **LWT-Food Science and Technology**, [s.l], v. 63, n. 2, p. 1236-1244, 2015.

FLORES, M.L; STORTZ. C. A; RODRÍGUEZ. M.C; CEREZO. A.S Studies on the skeletal cell wall and cuticle of the cystocarpic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa* Bory. **Botânica Marina**, [s.l], v.40, n.5, p. 411-419, 1997.

FONSECA, R. J.; OLIVEIRA, S. N. M.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M.; MOURÃO, P. A. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, [s.l], v. 99, n. 03, p. 539-545, 2008.

FREILE-PELEGRÍN, Y.; MURANO, E. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. **Bioresource Technology**, [s.l], v. 96, p. 295-302, 2005.

FURIE, B.; FURIE B. C. Molecular basis of blood coagulation. In: HOFFMAM, R.; BENZ, E. J. SHATTIL, S. J., FURIE. B. COHEN, H. J., SIBERSHIN L. J. MCGLOVE, P. (Eds) Hematology, Basic Principles and Practice, 3 ed. **Churchill Livingstone**, Philadelphia, [s.l], p. 1783-1804, 2000.

FURNEAUX, R. H.; MILLER, I. J.; STEVENSON, T. T. Agaroids from New Zealand members of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta)—a novel dimethylated agar. **Hydrobiologia**, [s.l], v. 204, n. 1, p. 645-654, 1990.

GANESAN, M.; REDDY, C. R.; ESWARAN, K.; JHA, B. Seasonal variation in the biomass, quantity and quality of agar from *Gelidiella acerosa* (Forsskal) Feldmann et Hamel (Gelidiales, Rhodophyta) from the Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve, India. **Phycological research**, [s.l], v. 56, n. 2, p. 93-104, 2008.

GANESAN, K.; KUMAR, K. S.; RAO, P. V. S. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, Enteromorpha from Okha, Northwest coast of India. **Innovative food science & emerging technologies**, [s.l], v. 12, n. 1, p. 73-78, 2011.

GARCIA-VAQUERO, M.; RAJAURIA, G.; O'DOHERTY, J. V.; SWEENEY, T. Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification. **Food Research International**, [s.l], v. 99, p. 1011-1020, 2017.

GENTRY, P. A. Comparative aspects of blood coagulation. **The Veterinary Journal**, [s.l], v. 168, n. 3, p. 238-251, 2004.

GRACHER, A. H. P. et al. Antithrombin and heparin cofactor II-mediated inactivation of α -thrombin by a synthetic, sulfated mannogalactan. **Thrombosis research**, [s.l.], v. 126, n. 3, p. 180-187, 2010.

GREINACHER, A.; WARKENTIN, T. E. Recognition, treatment, and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: review and update. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 118, p. 165-176, 2006.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Molecular weight distribution of polysaccharides from edible seaweeds by high-performance size-exclusion chromatography (HPSEC). **Talanta**, [s.l.], v. 93, p. 153-159, 2012.

GÜLCIN, İ. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life sciences**, [s.l.], v. 78, n. 8, p. 803-811, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; **Fundamentos de fisiologia médica**. Elsevier Brasil, 2017.

HA, C. E.; BHAGAVAN, N. V. **Essentials of medical biochemistry: with clinical cases**. Academic Press, USA, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HOUSSAY, A. B.; CINGOLANI, H. E. Fisiologia Humana de Houssay. 7ª Edição. **Porto Alegre: Editora Artmed**, p. 452-481, 2004

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H.S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, [s.l.], v.9, p.196-223, 2011.

JIN, N. Z.; GOPINATH, S. C. Potential blood clotting factors and anticoagulants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 84, p. 356-365, 2016.

KAKKAR, V. V.; HOWES, J.; SHARMA, V.; KADZIOLA, Z. A comparative, double-blind, randomised trial of a new second generation LMWH (bemiparin) and UFH in the prevention of post-operative venous thromboembolism. **Thrombosis and haemostasis**, [s.l.], v. 83, n. 04, p. 523-529, 2000.

KIM, T. K.; TIRLONI, L.; RADULOVIC, Z.; LEWIS, L.; BAKSHI, M.; HILL, C., VAZ I. S.; LOGULLO C.; TERMIGNONI C.; MULENGA, A. Conserved Amblyomma americanum tick Serpin19, an inhibitor of blood clotting factors Xa and XIa, trypsin and plasmin, has anti-haemostatic functions. **International journal for parasitology**, [s.l.], v. 45, n. 9, p. 613-627, 2015.

KJELLEN, L; LINDAHL, U. Proteoglycans: structures and interactions. **Annual review of biochemistry**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 443-475, 1991.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. Structure of the wall of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanography Marine Biological Annual Review**, [s.l.], v.26, p.259-315, 1988.

KNUTSEN, S. H.; MYSLABODSKI, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Botanica marina**, [s.l.], v. 37, n. 2, p. 163-170, 1994.

KUSAYKIN M; BAKUNINA I; SOVA V; ERMAKOVA S; KUZNETSOVA T; BESEDNOVA N. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 3, p. 904–915. 2008.

LAHAYE, M; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 8, n. 6, p. 1765-1774, 2007.

LEADLEY JR, R. J.; CHI, L.; REBELLO, S. S.; GAGNON, A. Contribution of *in vivo* models of thrombosis to the discovery and development of novel antithrombotic agents. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [s.l.], v. 43, p. 101-116. 2000.

LECHAT, H; AMAT, M; MAZOYER, J; BULÉON, A; LAHAYE, M. Structure and distribution of glucomannan and the sulfated glucan in the cell walls of the red algae *Kappaphycus alvarezzi* (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Phycology**, [s.l.], v.36, n.5, p.891-902, 2000.

LEE, W. K.; LIM, Y. Y.; LEOW, A. T. C.; NAMASIVAYAM, P.; ABDULLAH, J. O.; HO, C. L. Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 164, p. 23-30, 2017.

LEÓDIDO, A. C. M.; COSTA, L. E.; ARAÚJO, T. S.; COSTA, D. S.; SOUSA, N. A., SOUZA, L. K.; SOUSA F. B M.; FILHO M. D. S.; VASCONCELOS D. F. P.; SILVA F. R. P.; NOGUEIRA, K. M.; ARAUJO A. R.; BARROS F. C. N.; FREITAS A. L. P.; MEDEIROS J.V.R. Anti-Diarrhoeal Therapeutic Potential and Safety Assessment of Sulphated Polysaccharide Fraction from *Gracilaria intermedia* Seaweed in Mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 97, p. 34-45, 2017.

LI, B.; LU, F.; WEI, X.; ZHAO, R. Fucoidan: structure and bioactivity. **Molecules**, [s.l.], v. 13, p. 1671-1695, 2008.

LI, S.; SHAH, N. P. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. **Food chemistry**, [s.l.], v. 165, p. 262-270, 2014.

LI, N.; LIU, X.; HE, X.; WANG, S.; CAO, S.; XIA, Z.; XIAN, H.; QIN, L.; MAO, W. Structure and anticoagulant property of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Monostroma angicava*. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 159, p. 195-206, 2017.

- LIANG, W.; MAO, X.; PENG, X.; TANG, S. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate polymers**, [s.l], v. 101, p. 776-785, 2014.
- LIN, S. M.; FRESHWATER, D.W. The red algal genus *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta) from Taiwan, including *Gelidiella fanii* sp. nov. *Phycologia*. [s.l], v.47 n. 2, p.168-76. 2008.
- LIU, X.; SUN, Z.; ZHANG, M.; MENG, X.; XIA, X.; YUAN, W.; LIU, C. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Carbohydrate Polymers**, [s.l], v. 90, n. 4, p. 1664-1670, 2012.
- MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, [s.l], v. 202, n. 4931, p. 498, 1964.
- MACIEL, J. S.; CHAVES, L. S.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharides from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, [s.l], v. 71, n. 4, p. 559-565, 2008.
- MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, [s.l], v. 90, n. 3, p. 329-333, 2003.
- MARKS, D. L.; BUCHSBAUM, R.; SWAIN, T. Measurement of total protein in plant samples in the presence of tannins. **Analytical biochemistry**, [s.l], v. 147, n. 1, p. 136-143, 1985.
- MARTINICHEN-HERRERO, J. C.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, G. L., GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antithrombotic activities of a chemically sulfated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **International journal of biological macromolecules**, [s.l], v. 35, n. 1-2, p. 97-102, 2005.
- MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **The Journal of nutrition**, [s.l], v. 133, n.3, p. 933-940, 2003.
- MAZUMDER, S.; GHOSAL, P. K.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **International journal of biological macromolecules**, [s.l], v. 31, n. 1-3, p. 87-95, 2002.
- MCHUGH, D. J. A guide to seaweed industry. Rome: **FAO Fisheries Technical**, [s.l], n. 441, p.105, 2003.

- 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**, [s.l], v. 49, p. 491-498, 2002.
- MENAJOVSKY, L. B. Heparin-induced thrombocytopenia: clinical manifestations and management strategies. **The American journal of medicine**, [s.l], v. 118, n. 8, p. 21-30, 2005.
- MICHEL, G.; TONON, T.; SCORNET, D.; COCK, J. M.; KLOAREG, B. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. **New Phytologist**, [s.l], v. 188, n. 1, p. 82-97, 2010.
- MILLER, I. J.; FURNEAUX, R. H. The Structural Determination of the Agaroid Polysaccharides from Four New Zealand Algae in the Order Ceramiales by Means of ¹³C-NMR Spectroscopy. **Botanica marina**, [s.l], v. 40, n. 1-6, p. 333-340, 1997.
- MOHAMED, S.; HASHIM, S. N.; RAHMAN, H. A. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l], v. 23, n. 2, p. 83-96, 2012.
- MOLLET, J.; RAHAOUI, A.; LEMOINE, Y. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria cf. vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). **Journal of Applied Phycology**, [s.l], v. 10, n. 1, p. 59-66, 1998.
- MONROE, D.M.; HOFFMAN, M.; ROBERTS H.R. Platelets and thrombin generation. Arteriosclerosis, **Thrombosis and Vascular Biology**, [s.l], v.22, p.1381-1389, 2002.
- MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S.; PAVÃO, M. S. G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M.; MOWINCKEN, M-C.; ABILDGAARD, U. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm sulfated fucose high anticoagulant action, **J. Biol. Chem**, [s.l], v. 271, p. 23973-23984, 1996.
- MOURÃO, P. A.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, [s.l], v. 9, n. 8, p. 225-232, 2000.
- MOURÃO, P. A. Perspective on the use of sulfated polysaccharides from marine organisms as a source of new antithrombotic drugs. **Marine drugs**, [s.l], v. 13, n. 5, p. 2770-2784, 2015.
- MURANO, E. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, [s.l], v. 7, p. 245-254, 1995.

MUTHUSWAMY, E.; RAMADEVI, S. S.; VASAN, H. N.; GARCIA, C.; NOE, L.; VERELST, M. Highly stable Ag nanoparticles in agar-agar matrix as inorganic–organic hybrid. **Journal of Nanoparticle Research**, [s.l], v. 9, n. 4, p. 561-567, 2007.

NAESS, I. A.; CHRISTIANSEN, S. C.; ROMUNDSTAD, P.; CANNEGIETER, S. C.; ROSENDAAL, F. R.; HAMMERSTROM, J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. **Journal of thrombosis and haemostasis**, [s.l], v. 5, n. 4, p. 692-699, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2014.

NGO, D. H.; KIM, S. K. Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. **International journal of biological macromolecules**, [s.l], v. 62, p. 70-75, 2013.

NORRIS, L. A.; Blood coagulation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [s.l], v. 17, n. 3, p. 369-383, 2003.

OLIVEIRA, L. S.; RUFINO, M. S.; MOURA, C. F.; CAVALCANTI, F. R.; ALVES, R. E.; MIRANDA, M. R. The influence of processing and long-term storage on the antioxidant metabolism of acerola (*Malpighia emarginata*) purée. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [s.l], v. 23, n. 2, p. 151-160, 2011.

PASSALI, D.; CORALLO, G.; YAREMCHUK, S.; LONGINI, M.; PROIETTI, F.; PASSALI, G. C.; BELLUSSI, L. Oxidative stress in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, [s.l], v. 35, p. 420-425, 2015.

PEREIRA, M. S.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans?. **Glycobiology**, [s.l], v. 12, n. 10, p. 573-580, 2002.

PEREIRA, L.; SOUSA, A.; COELHO, H.; AMADO, A. M.; RIBEIRO-CLARO, P. J. Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, [s.l], v. 20, n. 4, p. 223-228, 2003.

PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M.; MELO, M. R.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. 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**, [s.l], v. 340, n. 12, p. 2015-2023, 2005.

PEREIRA, L.; GHEDA, S. F.; RIBEIRO-CLARO, P. J. Analysis by vibrational spectroscopy of seaweed polysaccharides with potential use in food, pharmaceutical, and cosmetic industries. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, [s.l], v. 2013, 2013.

PEREIRA, L.; NETO, J. M. (Ed.). **Marine algae: biodiversity, taxonomy, environmental assessment, and biotechnology**. CRC Press, 2014.

PEREIRA, J. G.; MESQUITA, J. X.; ARAGÃO, K. S.; FRANCO, Á. X.; SOUZA, M. H.; BRITO, T. V.; DIAS J. M., SILVA R. O.; MEDEIROS J.V. R.; OLIVEIRA J.S.; ABREU, C. M. W.; DE PAULA R.C.; BARBOSA A.L.R.; FREITAS A.L.P. Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses. **Carbohydrate polymers**, [s.l.], v. 108, p. 17-25, 2014.

PERCIVAL, E. L.; MCDOWELL, Richard H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. London, 1967.

PERRINAUD, A.; JACOBI, D.; MACHET, M. C.; GRODET, C.; GRUEL, Y.; MACHET, L. Bullous hemorrhagic dermatosis occurring at sites distant from subcutaneous injections of heparin: Three cases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s.l.], v. 54, n. 2, p. S5-S7, 2006.

PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Ed.). **Handbook of hydrocolloids**. USA Elsevier, 2009.

POMIN, V. H.; PEREIRA, M. S.; VALENTE, A. P.; TOLLEFSEN, D. M.; PAVÃO, M. S.; MOURÃO, P. Selective cleavage and anticoagulant activity of a sulfated fucan: stereospecific removal of a 2-sulfate ester from the polysaccharide by mild acid hydrolysis, preparation of oligosaccharides, and heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. **Glycobiology**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 369-381, 2004.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, [s.l.], v. 18, n. 12, p. 1016-1027, 2008.

POMIN, V. H. Structural and functional insights into sulfated galactans: a systematic review. **Glycoconjugate journal**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 1-12, 2010.

POMIN, V. H. Dual and antagonistic therapeutic effects of sulfated glycans. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 24, n. 18, p. 3965-3971, 2016.

PRADO, F. M.; FERNANDES, F. M.; NATALE, W. Efeito residual da escória de siderurgia como corretivo de acidez do solo na soqueira de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v.27, p.287-296, 2003.

PRAIBOON, J.; CHIRAPART, A.; AKAKABE, Y.; BHUMIBHAMOND, O.; KAJIWARA, T. Physical and Chemical Characterization of agar Polysaccharides Extracted from the Thai and Japanese Species of *Gracilaria*. **ScienceAsia**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 11-17, 2006.

PRASSAD, K; GOSWAMI, A. M.; MEENA, R.; RAMAVAT, B.K.; GHOSH, P. K.; SIDDHANTA, A.K. Superior quality agar from red alga *Gelidiella acerosa* (Rhodophyta, Gelidiales) from Gujarat coast of India: An evaluation. **Indian Journal of Marine Science**, [s.l.], v. 35, p. 268-274, 2007.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical biochemistry**, [s.l.], v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

QUEIROZ, I. N. Q.; RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERÉ, A. L. G.; HOLANDA, M. L.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B. Inhibition of coagulation proteases and thrombosis and sub-chronic toxicological study of a sulfated polysaccharidic fraction from the red alga *Gelidiella acerosa*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, [s.l.], v. 36, n. 4, 2014.

QUINDERÉ, A. L.; SANTOS, G. R. C.; OLIVEIRA, S. N.; GLAUSER, B. F.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; BENEVIDES M.N.B.; POMIN V.H.; MOURÃO, P. A. S. Is the antithrombotic effect of sulfated galactans independent of serpin?. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 43-53, 2014.

RAJAURIA, G.; FOLEY, B.; ABU-GHANNAM, N. Identification and characterization of phenolic antioxidant compounds from brown Irish seaweed *Himanthalia elongata* using LC-DAD–ESI-MS/MS. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [s.l.], v. 37, p. 261-268, 2016.

RAVEL, R. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RAVEN, P.H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 8. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

RITCHIE, R. H.; DRUMMOND, G. R.; SOBEY, C. G.; DE SILVA, T. M.; KEMP-HARPER, B. K. The opposing roles of NO and oxidative stress in cardiovascular disease. **Pharmacological research**, [s.l.], v. 116, p. 57-69, 2017.

ROCHAS, C.; LAHAYE, M.; YAPHE, W. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared-spectroscopy. **Botânica Marinha**, [s.l.], v. 29, n. 4, p. 335-340, 1986.

ROMERO, J. B.; VILLANUEVA, R. D.; MONTAÑO, M. N. E. Stability of agar in the seaweed *Gracilaria euchematoides* (Gracilariales, Rhodophyta) during postharvest storage. **Bioresource technology**, [s.l.], v. 99, n. 17, p. 8151-8155, 2008.

ROTH, G. A.; JOHNSON, C.; ABAJOBIR, A.; ABD-ALLAH, F.; ABERA, S. F.; ABYU, G.; ALLA, F. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. **Journal of the American College of Cardiology**, [s.l.], v. 70, n. 1, p. 1-25, 2017.

SALEHI, P.; DASHTI, Y.; TAJABADI, F. M.; SAFIDKON, F.; & RABEI, R. Structural and compositional characteristics of a sulfated galactan from the red alga *Gracilariopsis persica*. **Carbohydrate polymers**, [s.l.], v. 83, n. 4, p. 1570-1574, 2011.

SEEDEVI, P.; MOOVENDHAN, M.; VIRAMANI, S.; SHANMUGAM, A. Bioactive potential and structural characterization of sulfated polysaccharide from seaweed (*Gracilaria corticata*). **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 155, p. 516-524, 2017.

SILVA, D. DA C.; CERCHIARO, G.; HONORIO, K. M.. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 2, 2011.

SILVA R.O.; SANTOS G.M.P.; NICOLAU L.A.D.; LUCETTI, L.T.; SANTANA A.P.M.; CHAVES L.S. Sulfated-polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudate* protects mice gut against ethanol-induced damage. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 9, p. 2188–2200. 2011.

SILVA, R. O.; SANTANA, A. P. M.; CARVALHO, N. S.; BEZERRA, T. S.; OLIVEIRA, C. B.; DAMASCENO, S. R.; CHAVES L. S.; FREITAS A. L. P.; SOARES P. M. G.; SOUZA M. H. L. P.; BARBOSA A. L. R.; MEDEIROS J. V. R. A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Marine drugs**, [s.l.], v. 10, n. 12, p. 2618-2633, 2012.

SMITH, C.; HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. Protection by albumin against the pro-oxidant actions of phenolic dietary components. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 483-489, 1992.

SOUSA, N. A.; BARROS, F. C. N.; ARAÚJO, T. S.; COSTA, D. S.; SOUZA, L. K. M.; SOUSA, F. B. M.; LEODIDO, A. C. M.; PACIFICO, D. M.; ARAUJO, S.; BEZERRA, F. F.; FREITAS, A. L. P.; MEDEIROS, J. V. R. The efficacy of a sulphated polysaccharide fraction from *Hypnea musciformis* against diarrhea in rodents. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 86, p. 865-875, 2016.

SOUSA, W. M.; SILVA, R. O.; BEZERRA, F. F.; BINGANA, R. D.; BARROS, F. C. N.; COSTA, L. E.; SOMBRA, V. G.; SOARES, P. M.; FEITOSA, J. P.; DE PAULA, R. C.; SOUZA, M. H.; BARBOSA, A. L.; FREITAS, A. L. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 152, p. 140-148, 2016.

SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C., MARTINS, J. T.; TEIXEIRA, J. A.; COIMBRA, M. A.; VICENTE, A. A. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. 287-292, 2012.

STEPHEN, A. M. (Ed.). **Food polysaccharides and their applications**. CRC press, 1995.

STORTZ, C.A.; CASES, M.R.; CEREZO, A.S. The system of agaroids and carrageenans from the soluble fraction of the tetrasporic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa*. **Carbohydrate polymers**, [s.l.], v. 34, n. 1-2, p. 61-65, 1997.

STORTZ, C. A.; CEREZO, A. S. Novel findings in carrageenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. **ChemInform**, [s.l.], v. 33, n. 15, 2002.

SUDHARSAN, S.; SUBHAPRADHA, N.; SEEDEVI, P.; SHANMUGAM, V.; MADESWARAN, P.; SHANMUGAM, A.; SRINIVASAN, A. Antioxidant and anticoagulant activity of sulfated polysaccharide from *Gracilaria debilis* (Forsskal). **International journal of biological macromolecules**, [s.l], v. 81, p. 1031-1038, 2015.

SUDHARSAN, S.; GIJI, S.; SEEDEVI, P.; VAIRAMANI, S.; SHANMUGAM, A. Isolation, characterization and bioactive potential of sulfated galactans from *Spyridia hypnoides* (Bory) Papenfuss. **International journal of biological macromolecules**, [s.l], v. 109, p. 589-597, 2018.

TANG, L.; CHEN, Y.; JIANG, Z.; ZHONG, S.; CHEN, W.; ZHENG, F.; SHI, G. Purification, partial characterization and bioactivity of sulfated polysaccharides from *Grateloupia livida*. **International journal of biological macromolecules**, [s.l], v. 94, p. 642-652, 2017.

TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas bentônicas. **Revista Virtual de Química**, [s.l], v. 5, n. 3, p. 343-362, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

USOV, A. I.; YAROTSKY, S. V.; SHASHKOV, A. S. ^{13}C -nmr spectroscopy of red algal galactans. **Biopolymers**, [s.l], v. 19, n. 5, p. 977-990, 1980.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, [s.l], v. 12, p. 301-308, 1998.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. L.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans; application in research and industry. **Food Science & Technology**, [s.l], v. 13, p. 73-92, 2002.

VAN DE VELDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H. S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydrate Research**, [s.l], v. 339, n. 13, p. 2309-2313, 2004.

VILLANUEVA, R.; MONTANO, N. Highly methylated agar from *Gracilaria edulis* (Gracilariales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, [s.l], v. 11, p. 225-22, 1999.

VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina**, [s.l], v. 29, p. 1-7, 2009.

VIRCHOW, R. Gesammelte abhandlungen zur wissenschaftlichen medicin von Rudolf Virchow. **G. Grottesche Buchhandlung**, [s.l], 1862.

VOGEL, G. M. T.; MEULEMAN, D. G.; BOURGONDIËN, F. G. M.; HOBBELEN, P. M. J. Comparison of two experimental thrombosis models in rats effects of four glycosaminoglycans. **Thrombosis research**. [s.l], v.54, p. 399-419. 1989.

- WANG, J.; JIN, W.; HOU, Y.; NIU, X.; ZHANG, H.; ZHANG, Q. Chemical composition and moisture-absorption/retention ability of polysaccharides extracted from five algae. **International journal of biological macromolecules**, [s.l], v. 57, p. 26-29, 2013.
- WANG, J.; HU, S.; NIE, S.; YU, Q.; XIE, M. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s.l], v. 2016, 2016.
- WIJESEKARA I; PANGESTUTI R; KIM S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, [s.l], v. 11, p. 14–21. 2011.
- WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y. J. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s.l], v. 88, n. 1, p. 13-20, 2012.
- WOLBERG, A. S.; ALEMAN, M. M.; LEIDERMAN, K.; MACHLUS, K. R. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. **Anesthesia and analgesia**, [s.l], v. 114, n. 2, p. 275, 2012.
- WOLBERG, A. S.; ROSENDAAL, F. R.; WEITZ, J. I.; JAFFER, I. H.; AGNELLI, G.; BAGLIN, T.; MACKMAN, N. Venous thrombosis. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l], v. 1, p. 15006, 2015.
- YANG, Y., LIU, D.; WU, J.; CHEN, Y.; WANG, S. In vitro antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Corallina officinalis*. **International journal of biological macromolecules**, [s.l], v. 49, n. 5, p. 1031-1037, 2011.
- YUAN, Y.; MACQUARRIE, D. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. **Carbohydrate polymers**, [s.l], v. 129, p. 101-107, 2015.
- ZHANG, Z.; WANG, F.; WANG, X.; LIU, X.; HOU, Y.; ZHANG, Q. Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. **Carbohydrate Polymers**, [s.l], v. 82, n. 1, p. 118-121, 2010.