

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Samara Evangelista Reis**

**Polissacarídeos sulfatados da alga verde *Ulva lactuca* L.: caracterização química parcial e análise das atividades anticoagulante, antitrombótica e anti-inflamatória**

**Juiz de Fora**

**2016**

**Samara Evangelista Reis**

**Polissacarídeos sulfatados da alga verde *Ulva lactuca* L.: caracterização química parcial e análise das atividades anticoagulante, antitrombótica e anti-inflamatória**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valquíria Pereira de Medeiros

**Juiz de Fora**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Reis, Samara Evangelista.

Polissacarídeos sulfatados da alga verde *Ulva lactuca* L. : caracterização química parcial e análise das atividades anticoagulante, antitrombótica e anti-inflamatória / Samara Evangelista Reis. -- 2016.

135 p. : il.

Orientadora: Valquíria Pereira de Medeiros

Coorientador: Jair Adriano Kopke de Aguiar

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

1. *Ulva lactuca* L.. 2. Polissacarídeos sulfatados. 3. Anticoagulante. 4. Antitrombótica. 5. Anti-inflamatória. I. Medeiros, Valquíria Pereira de , orient. II. Aguiar, Jair Adriano Kopke de , coorient. III. Título.

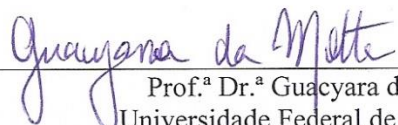
**Polissacarídeos sulfatados da alga verde *Ulva lactuca* L.:  
Caracterização química parcial e análise das atividades  
anticoagulante, antitrombótica e anti-inflamatória**

**Samara Evangelista Reis**

**ORIENTADOR (A): Valquíria Pereira de Medeiros**

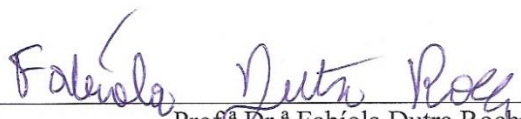
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 29/07/2016



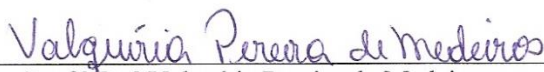
---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Guacyara da Motta  
Universidade Federal de São Paulo



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabíola Dutra Rocha  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valquíria Pereira de Medeiros  
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho aos meus pais, José Benício e Maria do Carmo, por serem para mim exemplos das mais belas virtudes da vida

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu refúgio e por conservar em mim a fé e a força, não me permitindo esmorecer diante dos desafios.

Ao meu pai, José Benício, por quem carrego a maior saudade. Mesmo nos deixando fisicamente no início deste projeto, soube se fazer presente em cada um dos dias e em cada momento. Agradeço por toda a confiança, o amor, companheirismo e por ser minha fonte de determinação.

A minha querida mãe, Maria do Carmo, por toda sua dedicação, carinho e amor durante toda minha vida, em especial durante esses dois últimos anos, por me ouvir, pela paciência, por compreender minhas ausências e por me manter firme nos meus propósitos.

A minha afilhada e sobrinha, Maria Clara, por cada sorriso que tornou os momentos difíceis, mais leves.

A minha irmã, Alessandra, por me ouvir muitas vezes, pelos conselhos, por todo incentivo e pela amizade.

Ao meu irmão, Leonardo, por todo apoio, pelo amparo, torcida e incentivo.

Ao Antonio que por vezes foi minha companhia nos fins de semana de experimento. Por me ouvir, pela paciência, por todo incentivo e pelo companheirismo.

Ao meu cunhado Carlos e a minha cunhada Aline pela torcida e pelo apoio.

À Professora Dr.<sup>a</sup> Valquíria Pereira de Medeiros pela oportunidade, por ter me acolhido como sua aluna e por ter acreditado em mim. Obrigada pela paciência, por esclarecer meus infinitos questionamentos, por cada conhecimento compartilhado e por toda contribuição para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao Professor Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar por me receber de portas abertas em seu laboratório, pela contribuição e por sempre estar disposto a discussões sobre o trabalho.

À Professora Dr.<sup>a</sup> Luciana Chedier, ao Professor Dr. Daniel Pimenta e ao Mestre Arthur Macedo pelas oportunidades, ensinamentos e pelo incentivo desde à graduação.

Aos colegas do Laboratório de Análise de Glicoconjugados Rafael, Camila, Laura, Gabriela, Camilinha, Franciane, Sara, Gustavo, Miramar, João, Lucas e Arthur pelos conhecimentos compartilhados e pela convivência durante esses dois anos no laboratório.

À Professora Dr.<sup>a</sup> Helena Nader (UNIFESP) pelo fornecimento da estrutura de seu laboratório para a realização de testes e aos colaboradores do laboratório de Biologia Molecular, em especial, a Dr.<sup>a</sup> Camila Accardo, pela ajuda com a realização dos testes em bancada.

Ao Professor Dr. Luiz Fernando e à Dr.<sup>a</sup> Lenize Maia pelo fornecimento da estrutura e suporte necessários a realização das análises espectroscópicas, agradeço a atenção e comprometimento.

Às minhas amigas Amanda, Josi, Ariane e as amigas de faculdade “Octano” pelo companheirismo e por compreenderem as minhas ausências.

À FAPEMIG pela bolsa concedida.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esta etapa da minha vida fosse concluída.

"O que dá o verdadeiro sentido ao encontro é a busca, e é preciso andar muito para se alcançar o que está perto."

José Saramago



## RESUMO

As doenças cardiovasculares, entre as quais se incluem as desordens trombóticas, estão entre as principais causas de mortalidade no mundo. A heparina é um polissacarídeo sulfatado de origem animal utilizado mundialmente como um agente terapêutico (anticoagulante e antitrombótico). Os polissacarídeos sulfatados (PS) de algas marinhas possuem estruturas complexas, o que tem tornado interessante os estudos de suas possíveis atividades biológicas. No presente trabalho, PS das algas *Ulva lactuca* L. (Ul) e *Fucus vesiculosus* L. (Fv) foram extraídos por proteólise enzimática, seguida de fracionamento com diferentes volumes de acetona. As frações obtidas foram, inicialmente, analisadas por eletroforese em gel de agarose. Os teores de proteínas, açúcares totais, ácidos urônicos e sulfato foram determinados por dosagens químicas e o peso molecular foi determinado por eletroforese em gel de agarose. A composição monossacarídica foi determinada por *Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis* (FACE) e por cromatografia em papel. Além disso, foram realizadas análises espectroscópicas por FT-IR/ATR e Raman. A atividade anticoagulante foi investigada por testes *in vitro* TTPa, TP, TT e ensaios cromogênicos (anti-fatores Xa e IIa). A atividade antitrombótica foi avaliada *in vivo* pelo modelo da ligadura da veia cava inferior em ratos *Wistar* e *in vitro*, pela dosagem de NO e pela dosagem da atividade de metaloproteinases em cultura de células de aorta de coelho (RAEC). A atividade anti-inflamatória foi investigada pela dosagem de NO, citocinas (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e metaloproteinases em cultura de macrófagos (RAW 264.7). As frações F50Ul, F70Ul, F50Fv e F70Fv apresentaram bandas na eletroforese em gel de agarose com metacromasia e padrão de migração característicos da presença de polissacarídeos sulfatados, levando a seleção dessas frações para análises posteriores. A análise da composição química revelou a presença de polissacarídeos ricos em sulfato e carboxila, o que foi confirmado pelas análises espectroscópicas. Os PS apresentaram elevado peso molecular, sendo que as frações de *U. lactuca* L. apresentaram como principal monossacarídeo a ramnose, além de glicose, galactose e ácidos urônicos, enquanto as frações de *F. vesiculosus* L., apresentaram fucose, glicose e ácidos urônicos. As frações F50Ul e F50Fv, F70Fv prolongaram o TTPa (0,1-1,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e inibiram a atividade dos fatores Xa e IIa (1  $\mu\text{g/mL}$ ). Além disso, essas frações (20  $\mu\text{g/g}$ ), apresentaram efeito antitrombótica *in vivo* após 24 horas de ação. F50Ul mostrou melhor atividade nas concentrações 5-10  $\mu\text{g/g}$  e apresentou um efeito tempo dependente, com inibição completa da formação de trombos decorridas 12 horas de ação (10  $\mu\text{g/g}$ ). Na avaliação *in vitro* F50Ul (25-100  $\mu\text{g/mL}$ ) aumentou a produção de NO pelas células endoteliais de aorta de coelho, sendo que após 12 horas de incubação esse aumento ocorreu de forma mais significativa. Em cultura de células RAW 264.7, os PS das algas foram capazes de interferir na produção de NO, interleucinas e metaloproteinases, sendo que F50Fv e F70Fv inibiram a resposta inflamatória, enquanto F50Ul estimulou o aumento destes mediadores. Os resultados obtidos sugerem atividades importantes para os PS de *U. lactuca* L. o que permite propor a continuação dos estudos para melhor entendimento dos mecanismos de ação envolvidos, bem como de suas estruturas.

**Palavras-chave:** *Ulva lactuca* L.. Polissacarídeos sulfatados. Anticoagulante. Antitrombótica. Anti-inflamatória.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases, including thrombotic disorders, are among the leading causes of mortality in the world. Heparin is a sulfated polysaccharide of animal origin used worldwide as a therapeutic agent (anticoagulant and antithrombotic). Sulfated polysaccharides (SP) of seaweed have complex structures, which have become interesting studies of their possible biological activities. In this study, SP from *Ulva lactuca* L. (UI) and *Fucus vesiculosus* L. (Fv) were extracted by enzymatic proteolysis, followed by fractionation with different volumes of acetone. The fractions obtained were initially analyzed by agarose gel electrophoresis. The amounts of proteins, total sugars, uronic acids, and sulfate were determined by chemical dosages, and molecular weight was determined by agarose gel electrophoresis. Monosaccharide composition was determined by Fluorophore-assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE) and by paper chromatography. Also, analyses were made by FTIR/ATR and Raman spectroscopy. Anticoagulant activity was investigated *in vitro* by TTPa, TP, TT and by chromogenic assays (anti-factor Xa and IIa). Antithrombotic activity was evaluated *in vivo* by cava vein ligation model in rats and *in vitro* by measurement of NO production and metalloproteinase activity dosage in rabbit aorta cells culture (RAEC). Anti-inflammatory activity was investigated by measurement of NO, cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and metalloproteinases in macrophage culture (RAW 264.7). F50UI, F70UI, F50Fv and F70Fv fractions presented bands with metachromasia and a migration pattern in agarose gel electrophoresis characteristic of the presence of sulfated polysaccharides led to the selection of fractions for further analyses. Chemical composition analysis revealed the presence of polysaccharides rich in sulfate and carboxyl, which was confirmed by spectroscopic analyses. SP had a high molecular weight, and *U. lactuca* L. fractions present rhamnose as major monosaccharide constituent, and glucose, galactose and uronic acids were also present., while *F. vesiculosus* L. fractions presented fucose, glucose and uronic acids. F50UI, F50Fv and F70Fv fractions prolonged the TTPa (0.1-1.0  $\mu\text{g/mL}$ ) and inhibited Xa and IIa factors activity (1 $\mu\text{g/ml}$ ). Also, these fractions (20  $\mu\text{g/g}$ ) showed *in vivo* antithrombotic effect after 24 hours of action. F50UI showed higher activity at concentrations (5-10  $\mu\text{g/g}$ ) and showed a time-dependent effect, with a complete inhibition of thrombus formation after 12 hours of action (10  $\mu\text{g/g}$ ). *In vitro* evaluation, F50UI (25-100  $\mu\text{g/mL}$ ) increased NO production by rabbit aortic endothelial cells and after 12 hours of incubation, this increase was more significantly. In RAW 264.7 cells culture, SP algae were able to interfere with NO production, interleukins, and metalloproteinases, and F50Fv and F70Fv inhibited inflammatory responses, while F50UI stimulated the increase of these mediators. The results suggest important activities for *U. lactuca* L. SP and allowing propose further study to understand better the mechanisms involved, as well as their structures.

**Keywords:** *Ulva lactuca* L.. Sulfated polysaccharides. Anticoagulant. Antithrombotic. Anti-inflammatory.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Vias envolvidas na cascata da coagulação .....	24
Figura 2 – Novo modelo da cascata da coagulação sanguínea.....	25
Figura 3 – Modelo esquemático da trombose.....	27
Figura 4 – Resposta imunológica inata .....	30
Figura 5 – Estrutura hexassacarídica básica da heparina .....	32
Figura 6 – Estrutura das unidades de repetição de algumas carragenanas .....	35
Figura 7 – Estrutura de polissacarídeos sulfatados de <i>F. vesiculosus</i> L. ....	36
Figura 8 – Estrutura das principais unidades de repetição das ulvanas.....	38
Figura 9 – Alga marinha verde <i>Ulva lactuca</i> L.....	52
Figura 10 – Alga marinha parda <i>Fucus vesiculosus</i> L.....	52
Figura 11 – Esquema do processo de extração dos polissacarídeos sulfatados das algas <i>Ulva lactuca</i> L. e <i>Fucus vesiculosus</i> L. ....	54
Figura 12 – Esquema do fracionamento do extrato bruto dos polissacarídeos com volumes crescentes de acetona PA.....	55
Figura 13 – Esquema ilustrativo do procedimento de ligadura da veia cava inferior.....	62
Figura 14 – Rendimento percentual das frações obtidas por precipitação com acetona das algas <i>U. lactuca</i> L e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	66
Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose das frações cetônicas das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	70
Figura 16 – Eletrofluorogramas dos produtos de hidrólise das frações de <i>U. lactuca</i> L.....	74
Figura 17 – Eletrofluorogramas dos produtos de hidrólise das frações de <i>F. vesiculosus</i> L....	76
Figura 18 – Cromatografia em papel dos produtos de hidrólise das frações de <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	77
Figura 19 –Espectros Raman das frações polissacarídicas de <i>U. lactuca</i> L. ....	79
Figura 20 – Estrutura do ácido aldobiurônico .....	81
Figura 21 –Espectros de infravermelho das frações polissacarídicas de <i>U. lactuca</i> L. ....	82

Figura 22 – Espectros Raman das frações polissacarídicas de <i>F. vesiculosus</i> L. ....	84
Figura 23 – Estrutura dos polissacarídeos sulfatados de <i>F. vesiculosus</i> L. ....	85
Figura 24 – Ensaio TTPa para frações dos polissacarídeos sulfatados das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	87
Figura 25 – Ensaio TP para frações dos polissacarídeos sulfatados das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	88
Figura 26 – Ensaio TT para frações dos polissacarídeos sulfatados das algas <i>F. vesiculosus</i> L. e <i>U. lactuca</i> L. ....	89
Figura 27 – Inibição dos fatores Xa e IIa pelas frações de polissacarídeos sulfatados das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	91
Figura 28 – Quadro resumo das atividades anticoagulante e antitrombótica das frações polissacarídicas de <i>U. lactuca</i> L. e de <i>F. vesiculosus</i> L. ....	93
Figura 29 – Atividade antitrombótica <i>in vivo</i> das frações cetônicas de <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	94
Figura 30 – Curva de dose resposta da fração F50U1 de <i>U. lactuca</i> L. ....	95
Figura 31 – Curva de dose resposta da fração F50U1 de <i>U. lactuca</i> L. ....	96
Figura 32 – Viabilidade celular da linhagem RAEC em presença das frações de polissacarídeos sulfatados das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	98
Figura 33 – Dosagem de óxido nítrico em células endoteliais após exposição às frações de polissacarídeos sulfatados das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	99
Figura 34 – Dosagem de óxido nítrico em células endoteliais após exposição à fração F50U1. ....	100
Figura 35 – Dosagem da atividade de MMP-2 em cultura de células endoteliais de aorta de coelho após incubação com polissacarídeos sulfatados de <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	103
Figura 36 – Viabilidade celular da linhagem RAW 264.7 em presença das frações de polissacarídeos sulfatados das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	104
Figura 37 – Dosagem de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 após exposição às frações de polissacarídeos sulfatados das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	105
Figura 38 – Dosagem de TNF- $\alpha$ em cultura de macrófagos RAW 264.7 após exposição às frações de polissacarídeos sulfatados das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	109
Figura 39 – Dosagem de interleucina IL-6 em cultura de macrófagos RAW 264.7 após exposição às frações de polissacarídeos sulfatados das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	110

Figura 40 – Dosagem da atividade de metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 em cultura de macrófagos RAW 264.7 após incubação com as frações de polissacarídeos sulfatados das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	113
Figura 41 – Quadro resumo dos efeitos das frações polissacarídicas sobre mediadores inflamatórios .....	115

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química das frações de <i>Fucus vesiculosus</i> L. e <i>Ulva lactuca</i> L.....	72
Tabela 2 – Composição monossacarídica das frações de <i>Ulva lactuca</i> L.....	75
Tabela 3 – Composição monossacarídica das frações de <i>Fucus vesiculosus</i> L.....	77
Tabela 4 – Atribuições das bandas de espectroscopia Raman.....	79
Tabela 5 – Atribuições das bandas de espectroscopia Infravermelho .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABST	2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AMAC	2-aminoacridona
APC	Células apresentadoras de antígenos
APS	Persulfato de Amônio
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
ATR	Reflexão total atenuada
BCA	Ácido bicinconínico
CaCO-2	Células de câncer de colon
CBR	Centro de reprodução animal
CCD	Cromatografia em camada delgada
CETAVLON	Cetiltrimetilamônio
CLP	Células de aorta de coelho
COX-2	Ciclooxigenase-2
CS	Condroitim sulfato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Demitilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DS	Dermatam sulfato
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
F30UI	Fração 0,3v. em acetona da alga <i>U. lactuca</i> L.

F50UI	Fração 0,5v. em acetona da alga <i>U. lactuca</i> L.
F70UI	Fração 0,7v. em acetona da alga <i>U. lactuca</i> L.
F100UI	Fração 1,0v. em acetona da alga <i>U. lactuca</i> L.
F30Fv	Fração 0,3v. em acetona da alga <i>F. vesiculosus</i> L.
F50Fv	Fração 0,5v. em acetona da alga <i>F. vesiculosus</i> L.
F70Fv	Fração 0,7v. em acetona da alga <i>F. vesiculosus</i> L.
F100Fv	Fração 1,0v. em acetona da alga <i>F. vesiculosus</i> L.
FACE	<i>Fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GCMS	Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas
GMPC	Monofosfato cíclico de guanosina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HepG2	Células de carcinoma hepatocelular
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HS	Heparan Sulfato
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
IR	Infravermelho
JEV	Vírus da encefalite Japônica
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LMWH	Heparinas de baixo peso molecular
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Linfócitos T



MCF-7	Células de adenocarcinoma mamário
MMP	Metaloproteinases
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NO	Óxido nítrico
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PDA	1,3-diaminopropano acetato
PGE-2	Prostaglandina E2
PS	Polissacarídeos sulfatados
TP	Tempo de protombina
RAW 264.7	Macrófagos murinos
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> - tetrametiletilenodiamina
TF	Fator tecidual
TGF- $\beta$ 1	Fator de crescimento transformador- $\beta$ 1
TIH	Trombocitopenia induzida por heparina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
TRL	Receptores <i>Toll-like</i>
TT	Tempo de trombina
UFH	Heparina não fracionada
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
2.1 HEMOSTASIA, COAGULAÇÃO E TROMBOSE .....	22
2.2 INFLAMAÇÃO .....	28
2.3 HEPARINA .....	31
2.4 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGA .....	33
2.4.1 <b>Considerações gerais</b> .....	33
2.4.2 <b>Atividades biológicas de polissacarídeos de algas marinhas</b> .....	38
2.4.2.1 Atividade anticoagulante .....	38
2.4.2.2 Atividade antiinflamatória e imunomodulatória .....	42
2.4.3 <b>Polissacarídeos sulfatados de <i>Ulva lactuca</i> L.</b> .....	44
2.4.3.1 Composição química.....	44
2.4.3.2 Atividades biológicas .....	46
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	49
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
4.1 MATERIAL .....	50
4.1.1 <b>Equipamentos</b> .....	50
4.1.2 <b>Reagentes</b> .....	50
4.1.3 <b>Algas marinhas</b> .....	51
4.1.4 <b>Linhagens celulares</b> .....	53
4.1.5 <b>Animais</b> .....	53
4.2 <b>EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS</b> .....	53
4.2.1 <b>Obtenção do pó cetônico</b> .....	53
4.2.2 <b>Proteólise</b> .....	54
4.2.3 <b>Fracionamento dos extratos brutos com acetona PA</b> .....	55
4.2.4 <b>Eletroforese em gel de agarose</b> .....	56
4.2.5 <b>Análise peso molecular</b> .....	56

4.3 ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS .....	57
4.3.1 Dosagem de açúcares totais .....	57
4.3.2 Dosagem de sulfato .....	57
4.3.3 Dosagem de proteínas .....	57
4.3.4 Dosagem de ácidos urônicos .....	57
4.3.5 Análise da composição monossacarídica das frações cetônicas .....	58
4.3.5.1 <i>Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis</i> (FACE) .....	58
4.3.5.2 Cromatografia descendente em papel .....	59
4.3.6 Espectroscopia RAMAN .....	60
4.3.7 Espectroscopia Infravermelho .....	60
4.4 ANÁLISES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS .....	60
4.4.1 Atividade anticoagulante <i>in vitro</i> .....	60
4.4.2 Atividade antitrombótica <i>in vivo</i> .....	61
4.4.3 Ensaio de viabilidade celular <i>in vitro</i> .....	63
4.4.4 Dosagem de óxido nítrico .....	63
4.4.5 Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-6) em cultura de células RAW 264.7 .....	64
4.4.6 Dosagem da atividade de metaloproteinases .....	64
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	65
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DAS ALGAS <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	66
5.1.1 Extração e rendimento das frações cetônicas obtidas das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	66
5.1.2 Perfil eletroforético dos polissacarídeos das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	69
5.1.3 Análise da composição química e massa molecular das frações polissacarídicas das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L.: F50UI, F70UI, F50Fv e F70Fv.....	71
5.1.4 Composição monossacarídica das frações F50UI, F70UI, F50Fv e F70Fv obtidas das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	73
5.1.5 Análises espectroscópica das frações F50UI, F70UI, F50Fv e F70Fv obtidas das algas <i>U. lactuca</i> L. e <i>F. vesiculosus</i> L. ....	78
5.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	85
5.2.1 Atividade anticoagulante <i>in vitro</i> .....	85

5.2.2 Atividade antitrombótica <i>in vivo</i> .....	93
5.2.3 Dosagem de óxido nítrico em cultura de células endoteliais de aorta de coelho .....	99
5.2.4 Dosagem atividade de metaloproteinases em cultura de células endoteliais de aorta de coelho .....	102
5.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA .....	104
5.3.1 Dosagem de óxido nítrico em cultura de macrófagos RAW 264.7.....	104
5.3.2 Dosagem de interleucinas em cultura de macrófagos RAW 264.7 .....	108
5.3.3 Dosagem da atividade de metaloproteinases em cultura de macrófagos RAW 264.7 .....	112
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>116</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>117</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>133</b>

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2014), as doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade em todo o mundo. Nos últimos anos, a incidência de doenças cardiovasculares e acidentes vasculares vêm aumentando, e estima-se que, em 2030, essas serão a causa de morte de mais de 23 milhões de pessoas por ano. Entre as disfunções cardiovasculares incluem-se as trombooses arteriais e venosas (OWENS; MACKMAN *et al.*, 2010).

Uma das principais maneiras de se combater a formação de trombos sanguíneos é pela administração de fármacos anticoagulantes. A heparina é um polissacarídeo sulfatado de origem animal mundialmente utilizado como agente terapêutico (anticoagulante e antitrombótico) na prevenção e no tratamento de pacientes acometidos por trombose venosa e arterial, causada por diferentes etiologias. Os agentes antitrombóticos disponíveis estão associados a um risco de complicações hemorrágicas, já que possuem como alvo os mesmos componentes do mecanismo de coagulação homeostático. A terapia com heparina também está relacionada a casos de trombocitopenia e risco de contaminação por partículas virais ou outros agentes que derivam da sua origem animal, como *prions* causadores da encefalopatia espongiforme, o que pode também comprometer seu uso terapêutico (WEIZT, 1994; NADER *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2004; SOKOLOVA, 2014).

Dessa forma, novas estratégias são necessárias para tratar e prevenir as doenças trombóticas. Os pesquisadores e a indústria farmacêutica estão em busca de uma substância anticoagulante ideal, ou seja, que apresente o melhor custo-risco-benefício, com o máximo de atividade antitrombótica e o mínimo de risco hemorrágico e efeitos colaterais do que as drogas em uso atualmente (BOUÇAS *et al.*, 2012).

Os possíveis locais de ação para compostos antitrombóticos incluem-se proteínas, lipídeos e células plasmáticas, além de células brancas e plaquetas (NADER *et al.*, 2001). O uso de agentes exógenos que mimetizam o papel das células endoteliais dos vasos sanguíneos, favorecendo a liberação de óxido nítrico (NO), de forma a atingir, entre outras, a atividade antiagregante plaquetária *in vivo* parece ser um mecanismo de ação atrativo (SUCHYTA; HANDA; MEYERHOFF, 2014).

A gama de ações terapêuticas desempenhadas por polissacarídeos sulfatados, tais como fucanas e galactanas, é muito ampla, no entanto, as atividades anticoagulante e antitrombótica são aquelas com maiores perspectivas de exploração (POMIM, 2014). As galactanas, por exemplo, são abundantes em algas vermelhas e em plantas vasculares. Constituídas por

estruturas heterogêneas, apresentam potente atividade anticoagulante e antitrombótica, possuindo mecanismos de ação complexos e distintos daqueles observados para heparina (QUINDERÉ *et al.*, 2014). Das algas pardas extrai-se as homofucanas e heterofucanas, polissacarídeos constituídos principalmente de L-fucose sulfatada e que, atualmente, são muito estudados com relação à atividade anticoagulante (ROCHA *et al.*, 2004). As algas verdes, por sua vez, apresentam polissacarídeos sulfatados mais heterogêneos como as ulvanas que podem conter resíduos de ramnose, galactose, manose, xilose, arabinose, glicose e ou ácidos urônicos (HASSAN *et al.*, 2011).

Os polissacarídeos sulfatados de algas também são muito estudados quanto as suas propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias, podendo interferir de diversas maneiras nessas atividades, por exemplo, alterando o mecanismo de regulação da produção de óxido nítrico pelas enzimas óxido nítrico sintase de macrófagos (LEIRO *et al.*, 2007; TABARSA; LEE; YOU, 2012), aumentando ou diminuindo o processo de adesão celular e migração leucocitária ou mesmo modulando a expressão de citocinas pró ou anti-inflamatórias (REZENDE *et al.*, 2013).

Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas destacam-se por sua complexidade estrutural, que resulta das muitas ligações monossacarídicas e distribuição de grupamentos sulfato, o que lhes conferem uma configuração estrutural única. Tal característica associada ao elevado potencial farmacológico desses compostos e a diversidade de espécies de algas existentes resultam numa amplitude de possibilidades de estudos (ROCHA *et al.*, 2004).

Os polissacarídeos da espécie de alga verde *U. lactuca* L., ao contrário do que ocorre para *F. vesiculosus* L., são escassamente estudados quanto as atividades anticoagulante e antitrombótica, o que torna interessante a realização do presente estudo.

Dada a complexidade estrutural dos polissacarídeos sulfatados de algas e, tendo em vista a extensa costa litorânea brasileira, onde são encontradas muitas espécies de algas, entre as quais *U. lactuca* L., se faz interessante e importante a realização de estudos com produtos naturais marinhos em busca de resultados que possam colaborar para o desenvolvimento de novos produtos com aplicações inovadoras na farmacologia e terapêutica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HEMOSTASIA, COAGULAÇÃO E TROMBOSE

O sistema hemostático está envolvido na manutenção da fluidez sanguínea, mas também compreende os mecanismos normais que impedem a perda de sangue a partir de lesões vasculares (COLMAN, 2006; MULLER; GAILANI; RENNÉ, 2011).

A hemostasia primária se dá pela adesão de plaquetas a colágeno e fator de *von Willebrand* no local da lesão, levando a agregação plaquetária e a formação de um tampão plaquetário. Posteriormente, ocorre uma série complexa de reações enzimáticas que envolvem proteínas da coagulação, culminando na formação de trombina, que converte o fibrinogênio em fibrina, de modo a formar um coágulo estável, sendo esta etapa conhecida como hemostasia secundária (COLMAN, 2006; MULLER; OWENS; MACKMAN, 2010; GAILANI; RENNÉ, 2011).

A partir desse estágio, o coágulo de fibrina deve ser removido para que ocorra o restabelecimento do lúmen vascular e do fluxo sanguíneo. O processo que realiza gradualmente a remoção dos depósitos de fibrina é chamado fibrinólise ou hemostasia terciária, e é regulado por proteínas ativadoras serino-proteases, metaloproteinases (MMPs) e proteínas inibidoras como as serpinas (COLLEN, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Em 1964, dois grupos independentes propuseram a hipótese da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação do sangue (MACFARLANE, 1964; DAVIE; RATNOFF, 1964). De acordo com a qual, a coagulação do sangue pode ser iniciada através de duas cascatas convergentes: a via extrínseca e a via intrínseca, que culminam com a formação de fibrina (OWENS; MACKMAN, 2010).

A via extrínseca (Figura 1) é desencadeada quando fator VII (FVII) circulante se liga ao seu receptor presente na membrana, fator tecidual (TF), que é expresso em células subendoteliais de vasos sanguíneos, e exposto ao sangue quando a vasculatura normal é interrompida em decorrência de alguma lesão. Uma vez ligado a TF, FVII é auto-clivado para formar FVIIa. O complexo FVIIa-TF cliva o fator X (FX) em sua forma ativa (FXa). FXa é uma enzima comum a ambas vias de coagulação (extrínseca e intrínseca). FXa associa-se com fator V (FV) para formar protrombinase (FXa-FVa) que converte protrombina em trombina, essa última cliva o fibrinogênio para formar fibrina, iniciando desse modo a formação do

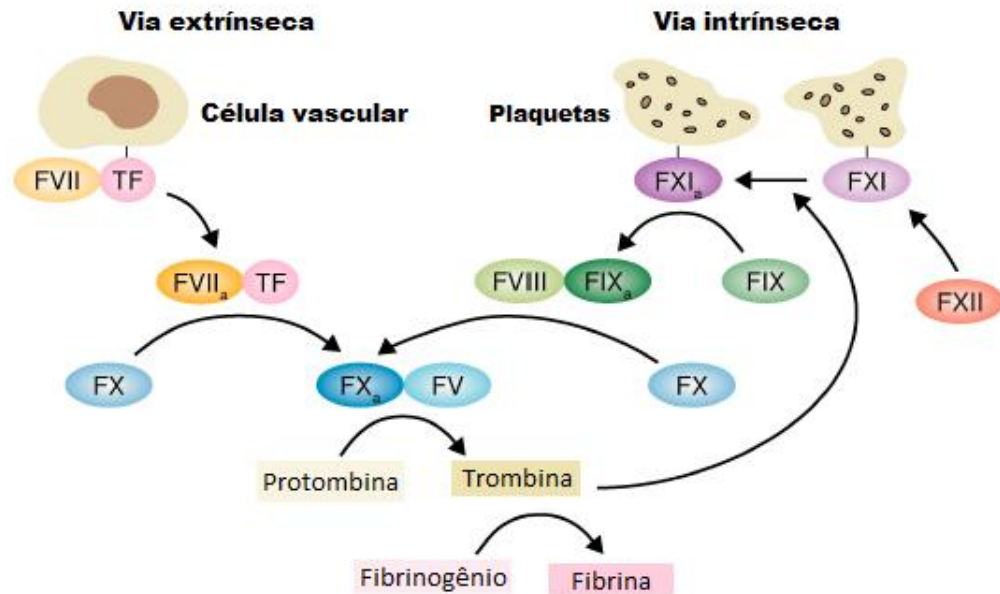
coágulo (COLMAN, 2006; OWENS; MACKMAN, 2010; MULLER; GAILANI; RENNÉ, 2011).

De acordo com esse modelo, a via intrínseca (Figura 1), inicia-se pela ativação do fator XII, o que ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas, tal processo é denominado “ativação por contato” (FRANCO, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2012). Em condições *in vitro*, a ativação do fator FXII por poliânions inorgânicos tais como o vidro, o silicato ou ácido elágico desencadeiam a ativação de contato, que é o início do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), um dos testes de diagnóstico de coagulação mais comumente utilizadas na prática clínica para o rastreamento e monitoramento de anticoagulação (MULLER; GAILANI; RENNÉ, 2011). Em condições *in vivo* a ativação de FXII pode ocorrer pelo contato com uma variedade de polifosfatos com cargas negativas, que incluem RNA extracelular, DNA e polifosfato inorgânico (pólipo), que são liberados durante a lesão celular e infecção (GEDDINGS; MACKMAN, 2014).

O cininogênio de alto peso molecular, uma proteína do sistema calicreína-cinina do plasma, sintetizada e liberada a partir de fígado, é responsável pela associação da pré-calicreína e de FXI com a superfície celular. Essa proteína atua como cofator do sistema de contato, que converte a pró-enzima pré-calicreína em calicreína, que também são proteínas do sistema calicreína-cinina do plasma. A calicreína, assim formada, cliva o cininogênio de alto peso molecular e acelera a conversão do FXII em FXIIa, o qual também é capaz de se auto ativar. O cininogênio de alto peso molecular libera bradicinina após clivagem pela calicreína, que é um potente liberador do plasminogênio tecidual e de NO e prostaciclina pelas células endoteliais (SCHMAIER; MCCRAE, 2007; WU *et al.*, 2010; SCHMAIER, 2016).



Figura 1 – Vias envolvidas da cascata da coagulação



Fonte: Adaptado de Colman (2006).

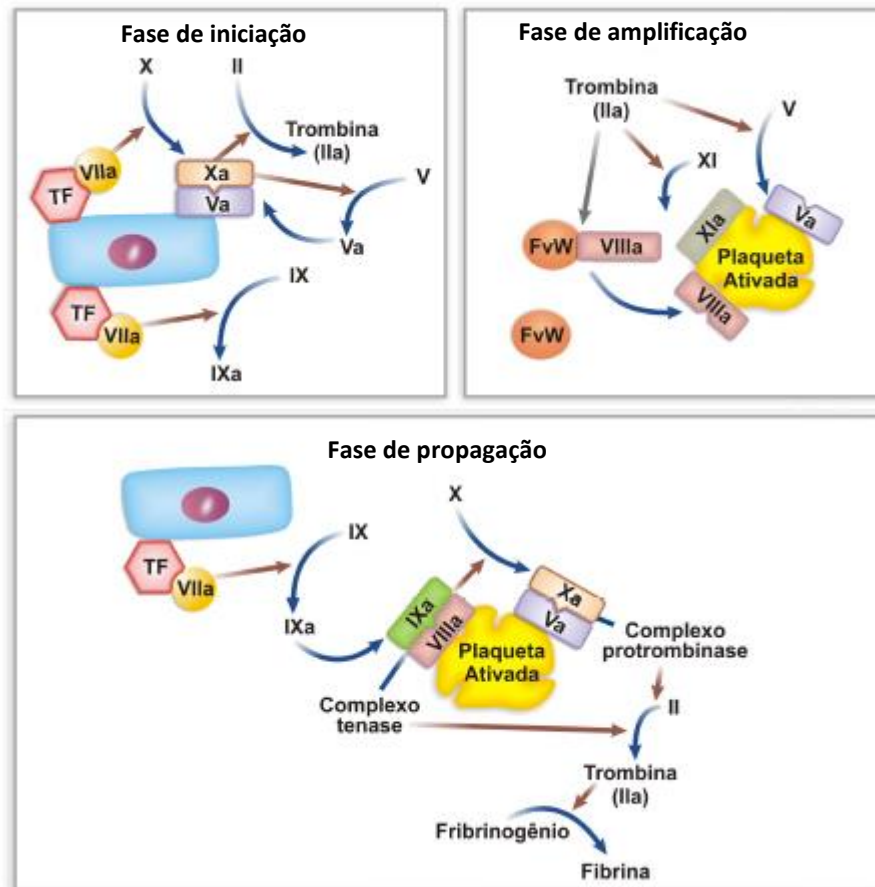
O FXIIa converte o FXI inativo à sua forma ativa (FXIa) (RODRIGUES *et al.*, 2012). O fator XI (FXI), é um fator que se associa a plaquetas ativadas, pode ser diretamente ativado ainda por trombina, alimentando a via intrínseca ao ativar FIX, formando FIXa, que por sua vez, irá ativar o fator FX na presença do fator VIII (FVIII). Como resultado, há produção de trombina e a formação do coágulo (COLMAN, 2006; OWENS; MACKMAN, 2010; MULLER; GAILANI; RENNÉ, 2011).

Recentes estudos no conceito de cascata da coagulação, gerados por observações clínicas e experimentais, demonstraram que o modelo da cascata clássica proposto em 1960 pode não refletir completamente a hemostasia *in vivo*. Atualmente, o modelo proposto sugere o envolvimento de três fases: iniciação, amplificação e propagação (RODRIGUES *et al.*, 2012)

Por esse modelo (Figura 2), na fase de iniciação, o complexo FT-FVIIa, formado após exposição do fator tecidual a circulação, tem como substratos principais o fator X e também o fator IX, cuja clivagem resulta na formação de FXa e FIXa, respectivamente, com subsequente formação de trombina e fibrina. Os traços ou quantidades mínimas de trombina formada são gerados a partir do complexo “protrombinase” (FXa/FVa). Na fase de amplificação, a trombina formada inicialmente é capaz de ativar o fator V em fator Va, e o fator VIII em fator VIIIa. As duas reações, envolvendo ativação de procofatores são fundamentais para a fase de propagação, na qual ocorre a formação do complexo “tenase” intrínseco (FIXa/FVIIIa), que converte o fator X em fator Xa, e do complexo “protrombinase” (FXa/FVa), que converte a protrombina em

trombina (Figura 2) (FRANCO, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2012; MULLER; GAILANI; RENNÉ, 2011).

Figura 2 – Novo modelo da cascata da cascata da coagulação sanguínea



Fonte: Adaptado de RODRIGUES *et al.*, 2012

Apesar do seu papel indispensável na formação de fibrina no teste TTPa, estudos recentes têm mostrado que FXII pode desempenhar um papel na trombose, mas não na hemostasia *in vivo* (MULLER; GAILANI; RENNÉ, 2011; GEDDINGS; MACKMAN, 2014).

Acredita-se que a atividade hemostática desregulada está associada a desequilíbrios nos processos pró-coagulante, anticoagulante e fibrinolítico do sistema de coagulação. Tal formação anormal de coágulos no sangue podem levar à ocorrência de eventos trombóticos (DROZD *et al.*, 2011), embolia pulmonar e outras doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (MULLER; GAILANI; RENNÉ, 2011; GUEDDINGS; MACKMAN, 2014).

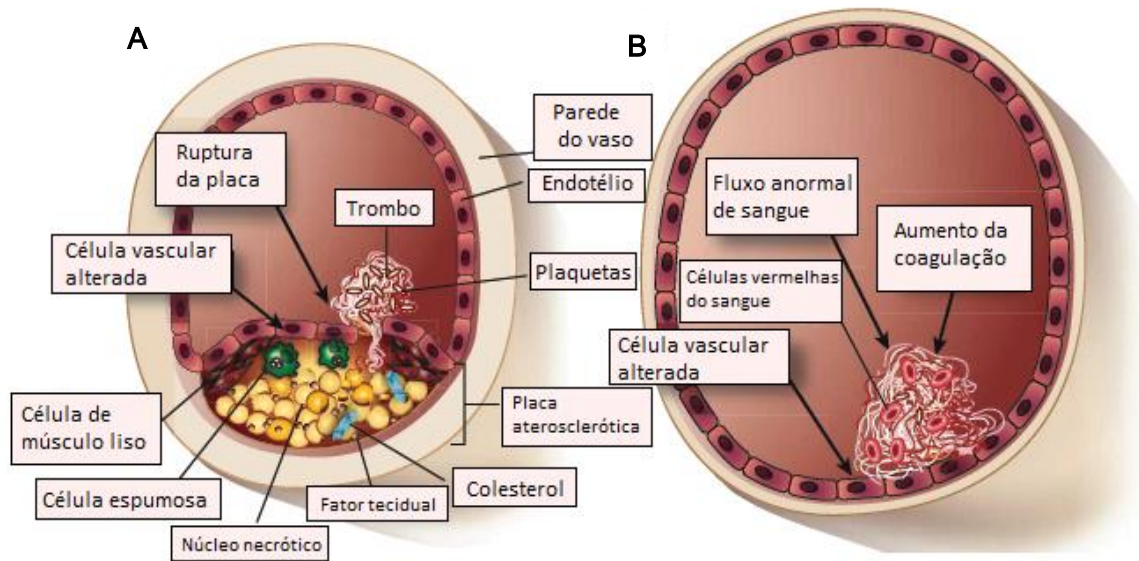
Coágulos hemostáticos são localizadas na parede do vaso e não prejudicam o fluxo de sangue no vaso. Em contraste, os coágulos trombóticos podem levar a insuficiência da circulação sanguínea e mesmo em oclusão completa do vaso, o que caracteriza a trombose

propriamente dita. Os eventos trombóticos comumente resultam de uma resposta patológica à lesão vascular e os trombos são formados por plaquetas ativadas e por fibrina (OWENS; MACKMAN, 2010).

As trombose podem ser de dois tipos: trombose venosa e trombose arterial (MULLER; GAILANI; RENNÉ, 2011). A trombose venosa (Figura 3A), compreendendo trombose venosa profunda e embolia pulmonar, é uma doença comum e que se repete com frequência. Ocorre com uma incidência anual de cerca de 1-2 por 1000 adultos (CUSHMAN, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2012), sendo considerada a terceira principal causa de morte cardiovascular em países desenvolvidos (OWENS; MACKMAN, 2010). A trombose venosa profunda, comumente formada nas grandes veias da perna, é composta principalmente por glóbulos vermelhos e de fibrina (conhecidos como coágulos vermelhos), enquanto a embolia pulmonar ocorre quando parte do trombo se desprende e desloca-se para o pulmão, resultando na oclusão parcial ou completa do fluxo sanguíneo na artéria pulmonar (OWENS; MACKMAN, 2010). Os principais fatores de risco para trombose venosa, além da idade, incluem fatores exógenos, tais como cirurgia, hospitalização, imobilidade, trauma, gravidez, puerpério e uso de hormônios, além de fatores endógenos, como câncer, obesidade, hereditariedade e distúrbios adquiridos de hipercoagulabilidade como a trombofilia (CUSHMAN, 2007; OWENS; MACKMAN, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2012).

A trombose arterial (Figura 3B), por sua vez, é a causa mais comum de morte em países desenvolvidos (OWENS; MACKMAN, 2010). Essa doença está associada a um processo complexo de formação de placas conhecidas como ateromas no revestimento interno das artérias (aterosclerose). A instabilidade ou ruptura da placa aterosclerótica leva a exposição de moléculas pró-coagulantes no vaso, que ao se associarem a fatores de coagulação, promovem a formação de trombos, capazes de interromper o fluxo sanguíneo “*in situ*” ou se deslocar, alojando-se nas artérias distais, onde impedem o fluxo (OWENS; MACKMAN, 2010; LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011). Os trombos arteriais são ricos em plaquetas e por isso conhecidos como coágulos brancos. Vários fatores de risco podem aumentar a incidência de trombose arterial, tais como tabagismo, hipertensão, hiperlipidemia e diabetes mellitus (OWENS; MACKMAN, 2010).

Figura 3 – Modelo esquemático da trombose



(A) Trombose arterial; (B) Trombose venosa. Fonte: Adaptada de Mackman (2008).

Li e colaboradores (2014) destacam o papel das células endoteliais vasculares na manutenção da integridade estrutural e funcional do sistema vascular. Essas células sintetizam e liberam mediadores vasodilatadores e vasoconstritores, que participam da regulação do sistema cardiovascular. Alterações destas substâncias derivadas do endotélio caracterizam a disfunção endotelial que resulta em patologias cardiovasculares e trombóticas.

Entre esses mediadores está o heparan sulfato, um glicosaminoglicano presente na matriz extracelular de células endoteliais, que regula a hemostasia do sangue, e possui também atividade anticoagulante e antitrombótica. A possibilidade de que os proteoglicanos derivados das células endoteliais possam interagir com a protrombina não é excluída, no entanto sugere-se um mecanismo importante através do qual estes produtos das células endoteliais inibem a coagulação através da neutralização do fator X ativado. De acordo com o modelo clássico de coagulação, a neutralização desta enzima é realizada pelo seu inibidor, a antitrombina III. Dessa forma, o papel dos proteoglicanos de sulfato de heparan pode ser o de acelerar a velocidade de inativação do fator X ativado pelo seu inibidor (COLBURN; BUONASSISI, 1982).

Outro mediador envolvido no controle da hemostasia é o óxido nítrico (NO). Essa é uma molécula polivalente produzida por uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintases, localizadas numa variedade de tipos celulares, desde o endotélio vascular até os neurônios. A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é ativada por estresse na interface da célula endotelial,

produzindo NO que se difunde para fora do lúmen do vaso para relaxar o músculo liso da vasculatura e ou para dentro do lúmen, inibindo a agregação plaquetária (VANNI *et al.*, 2007). Entre suas várias funções no organismo, ressalta-se aqui, a inibição das plaquetas em todos os seus níveis de atuação (desde adesão até agregação), o que é importante no controle da formação de trombos no organismo. A maioria dos mecanismos de ação do NO sobre as plaquetas é mediada pela enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) e pelo mensageiro monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) ou através de outras reações químicas (COOKE; DZAU, 1997; VANNI *et al.*, 2007). Segundo Suchyta, Handa e Meyerhoff (2014), a atividade antiplaquetária do NO pode ser atribuída à sua capacidade de aumentar o GMPc dentro das plaquetas, o que diminui a concentração de  $Ca^{2+}$ , que é necessário para a ativação plaquetária.

De acordo com Irokawa e colaboradores (1997), o NO além de interferir na atividade plaquetária, desempenha funções no sistema da coagulação. Esses autores mostraram que a inibição da síntese de NO em células endoteliais inibe de forma específica a expressão de heparan sulfato, que é um anticoagulante endotelial. A inibição da síntese de NO pode alterar funções endoteliais incluindo à ligação de antitrombina III a proteínas da coagulação.

## 2.2 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta do corpo a danos teciduais ou celulares causados por patógenos ou estímulos nocivos como lesões químicas e ou físicas. A resposta à inflamação aguda, composta por eventos não imunológicos (resposta inata), desenvolve-se em curto prazo e geralmente resulta na cura, que se dá pela infiltração de leucócitos na região danificada, pela remoção do estímulo e pela reparação tecidual. A inflamação crônica, por outro lado, é um processo prolongado e desregulado, que envolve reações imunológicas específicas (resposta adquirida), levando a destruição de tecidos e tentativas de reparação tecidual. Tal inflamação persistente é associada com muitas condições humanas crônicas e doenças, incluindo a alergia, aterosclerose, câncer, artrite e doenças autoimunes (WEISS, 2008; RANG *et al.*, 2012).

O principal objetivo dessas respostas é proteger o organismo, no entanto, se desenvolvidas de forma inapropriada tornam-se prejudiciais às células normais do indivíduo, sendo necessário que os mediadores inflamatórios envolvidos sejam modulados negativamente (MEDZHITOV, 2008; CRUVINEL *et al.*, 2010).

A imunidade inata envolve ocorrência de eventos vasculares e celulares. Inicialmente, em decorrência da presença de um agente nocivo, há formação de mediadores químicos

(histamina, prostaglandinas) que promovem a dilatação vascular, resultando no aumento do fluxo sanguíneo e, por último, no aumento da permeabilidade vascular, formando um exsudato líquido. Esse exsudato contém diversos mediadores químicos, entre os quais componentes dos sistemas: complemento, fibrinolítico, das cininas e da coagulação (CRUVINEL *et al.*, 2010; FREIRE; DYKE, 2013).

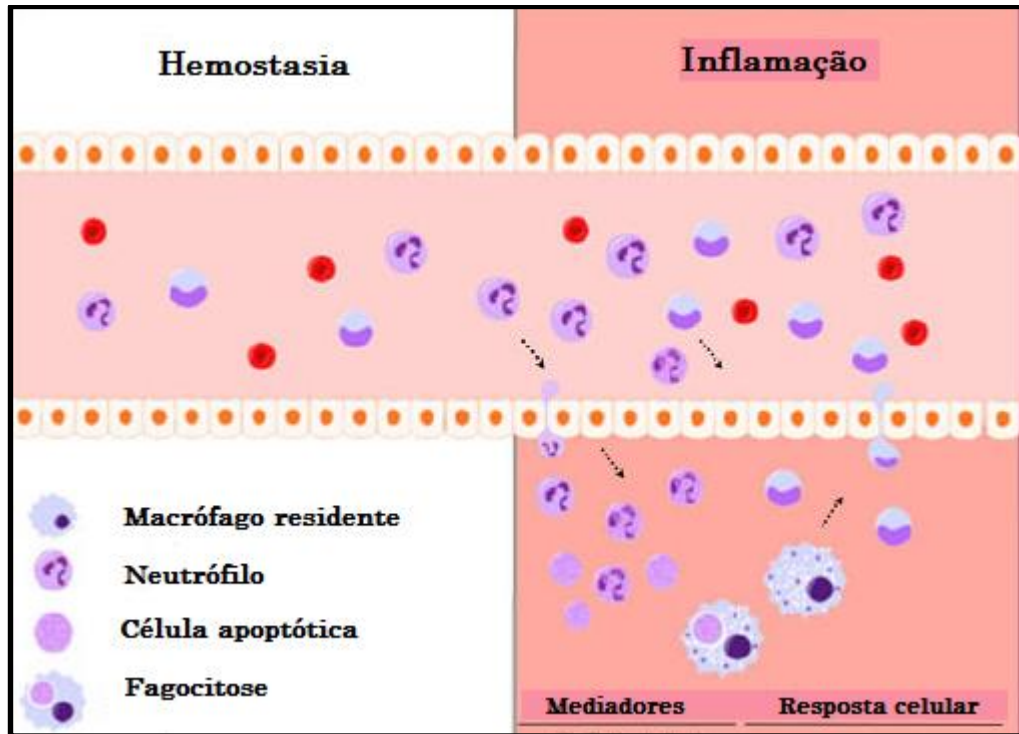
Dentre as células envolvidas na inflamação estão às células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos teciduais, além de plaquetas e leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos) (RANG *et al.*, 2012). As células endoteliais vasculares possuem função ativa na inflamação, por exemplo, ao secretar óxido nítrico, levando a vasodilatação. Além disso, elas secretam moléculas de adesão como as selectinas, importantes na migração celular (RANG *et al.*, 2012).

O endotélio dos vasos sanguíneos ativado permite o extravasamento seletivo de neutrófilos (Figura 4), que se dá pela ligação das selectinas de células endoteliais com integrinas e receptores de quimiocinas nos leucócitos (FREIRE; DYKE, 2013; SREERAMKUMAR *et al.*, 2014). Os neutrófilos estão entre as primeiras células a migrarem dos vasos para os tecidos atraídos por citocinas, como a IL-8, e são ativados por diversos estímulos, como produtos bacterianos, proteínas do complemento (C5a), imunocomplexos e quimiocinas. Ao atingirem o tecido lesado tentam destruir os agentes invasores. Além de possuírem capacidade fagocitária, os neutrófilos também atuam ao sofrer degranulação, liberando o conteúdo dos seus grânulos tóxicos, os quais incluem espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio, proteinase, catepsinas, gelatinases e elastase neutrofílica, além de mieloperoxidase (MEDZHITOV, 2008; CRUVINEL *et al.*, 2010).

As metaloproteinases (MMP) são uma família de endopeptidases dependentes de zinco capazes de digerir componentes da membrana basal e da matriz extracelular, que estão envolvidas na quebra da matriz extracelular durante desenvolvimento, na remodelação de tecidos e durante condições fisiológicas de migração celular, como a inflamação. Além disso, as MMP têm importantes funções imunoregulatórias, incluindo a modulação de citoquinas, quimiocinas e recrutamento de leucócitos (PARKS, WILSON e LÓPEZ-BOADO, 2004).

Essas metaloproteinases podem ser classificadas em subgrupos de acordo com seus domínios estruturais e a especificidade de substrato em collagenases, gelatinases, estromelinas, MMP tipo membrana, entre outros. As MMP 2 e 9 são classificadas como gelatinases, sendo MMP-2 a gelatinase A e MMP-9 a gelatinase B (PAKOZDI *et al.*, 2006).

Figura 4 – Resposta imunológica inata



Fonte: Adaptado de Freire e Dyke (2013).

Os monócitos seguem os neutrófilos e, de forma mais tardia, também infiltram nos tecidos em resposta a danos ou infecção. Nos tecidos, os monócitos são transformados em macrófagos e, ao contrário dos neutrófilos, podem permanecer nesse local por muito tempo, onde atuarão como fagócitos eficientes (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Além de seu papel na imunidade inata, no processo inflamatório, os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos (APC), potencializando a ativação de linfócitos T (LT) e linfócitos B (LB) pela expressão de moléculas coestimuladoras, e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e quimiocinas. Essas células também produzem espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e intermediários reativos do nitrogênio como o óxido nítrico (NO) (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Nas reações inflamatórias o NO é principalmente produzido pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS), presente em quase todas as células inflamatórias (ABBAS; LICHTMAN, 2005). O NO resultante da ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitos e células tumorais (JAMES, 1995). Possui principalmente atividades pró-inflamatórias, promovendo a vasodilatação, aumentando a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (RANG *et al.*,

2012). No entanto, quando produzido pela enzima óxido nítrico sintase das células endoteliais (eNOS), o NO também inibe a agregação plaquetária e a adesão de neutrófilos e monócitos ao endotélio (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas. As principais características da resposta adquirida são a especificidade e a diversidade de reconhecimento e a memória. Embora as principais células envolvidas na resposta imune adquirida sejam os linfócitos, as APC desempenham papel fundamental em sua ativação, apresentando antígenos associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, major histocompatibility complex) para os linfócitos T (CRUVINEL *et al.*, 2010).

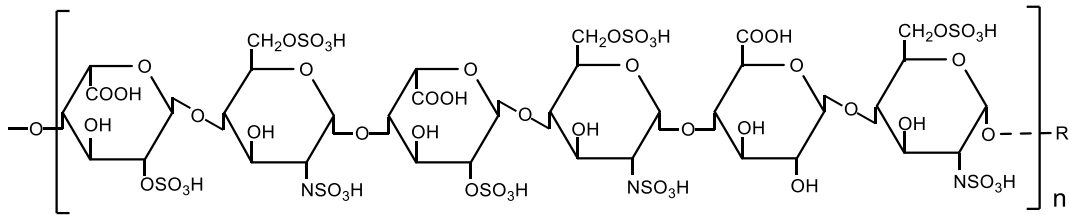
Através de uma série de eventos envolvendo a liberação de produtos pró-inflamatórias, os leucócitos e macrófagos procuram eliminar os agentes infecciosos e podem resolver a inflamação. O contrário ocorre quando os estímulos persistem e os neutrófilos e macrófagos continuam a acumular-se, gerando danos irreversíveis que caracteriza inflamação crônica (MEDZHITOV, 2008; NAHRENDORF; SWIRSKI, 2015).

## 2.2 HEPARINA

A heparina, descoberta por Jay McLean no Canadá em 1916, foi o primeiro composto utilizado como agente anticoagulante e antitrombótico e é, principalmente, obtida da mucosa intestinal suína e bovina, além de pulmão bovino. Sendo um polissacarídeo sulfatado, a unidade estrutural básica da heparina é um hexassacarídeo octassulfatado (Figura 5) constituído essencialmente por dois tipos de dissacarídeos, um trissulfatado e um dessulfatados na proporção 2:1. Sendo o primeiro formado por  $\alpha$ -D-glicosamina, *N*-6-dissulfatada, unida por ligação  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) ao ácido  $\alpha$ -L-idurônico 2,0-sulfatado, e o outro dissacarídeo apresenta  $\alpha$ -D-glicosamina, *N*-6-dissulfatada, unida ao ácido  $\beta$ -D-glicurônico, por ligação  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) conforme demonstrado na Figura 5, podendo ocorrer pequenas variações em heparinas de diferentes origens (SILVA; DIETRICH, 1975).



Figura 5 - Estrutura hexassacarídica básica da heparina



Fonte: Adaptado de NADER *et al.*, 2004.

A atividade da heparina como anticoagulante é dependente da formação de um complexo ternário entre heparina e antitrombina III e com diferentes serina-proteases da cascata da coagulação. Na presença de heparina, a inibição da trombina por antitrombina III é acelerada em mais de 1000 vezes. A heparina é também capaz de potencializar o efeito de outra serpina, o cofator II da heparina, específico para trombina. A inibição da trombina leva a inibição da conversão de fibrinogênio em fibrina, o que interfere na formação do coágulo. Além disso, pode atuar aumentando a síntese do inibidor da via do fator tecidual por células endoteliais (NADER *et al.*, 2001). Estudos estruturais pioneiros que buscavam investigar que região da estrutura da heparina seria responsável pela ligação com a antitrombina III revelaram que esta interação se deve a estrutura do pentassacarídeo: ( $\alpha$ -D-glicosamina, N-6-sulfatada) 1 $\rightarrow$ 4 ( $\beta$ -D-ácido glicurônico) 1 $\rightarrow$ 4 ( $\alpha$ -D-glicosamina, 3,6 desulfatados) 1 $\rightarrow$ 4 ( $\alpha$ -L-ácido idurônico, 2 sulfatado) 1 $\rightarrow$ 4 (D-glicosamina, N-6-dissulfatada) (CHOAY *et al.*, 1983).

Sabe-se que as células endoteliais, em presença de heparina, podem aumentar a síntese de heparan sulfato, um proteoglicano da superfície celular e da matriz extracelular, com efeito antitrombótico (NADER *et al.*, 1989; MEDEIROS *et al.*, 2012). Diferentes tipos de heparina exógena (heparina não modificada, heparina de baixo peso molecular, oligossacarídeos de heparina e vários derivados não-anticoagulantes de diferentes tamanhos) podem interferir em diferentes graus na síntese de heparan sulfato, dependendo, entre outros fatores, das semelhanças entre suas estruturas com as sequências de heparan sulfato biologicamente ativas (NADER *et al.*, 2004; CASU, NAGGI;TORRI, 2010).

As heparinas não fracionadas (UFH) de origem suína e bovina que são usadas no tratamento e prevenção de eventos tromboticos são constituídas por cadeias moleculares de diferentes tamanhos, variando entre 2000 a 40.000 Da (NADER *et al.*, 2004).

As heparinas de baixo peso molecular (LMWH), que podem resultar de processos de despolimerização químicos e enzimáticos a partir de heparina não fracionada, compartilham características funcionais com as UFH, no entanto, o processo de despolimerização utilizado

para a sua produção pode levar a características estruturais e funcionais particulares (LIMA; NADER, 2014).

Vale lembrar que, a longo prazo, a terapia com heparina está relacionada com um número de efeitos colaterais, tais como hemorragias, trombocitopenia, alterações no metabolismo dos lipídeos e osteoporose (WIJESINGHE; JEON; 2012). Uma forma menos frequente, porém mais severa de trombocitopenia, chamada de trombocitopenia induzida por heparina (TIH), pode ocorrer em aproximadamente 3% dos pacientes expostos a UFH, sendo caracterizada pela produção de anticorpos contra o complexo formado, heparina-fator plaquetário 4, induzindo a ativação das plaquetas, que promovem geração de trombina e agregação plaquetária (AREPALLY; ORTEL, 2010).

Além dos riscos relacionados à terapia anticoagulante, considerando-se a origem animal da heparina, a possibilidade de existência de impurezas é relativamente grande. Contaminantes biológicos incluem vírus, endotoxinas bacterianas, agentes da encefalopatia espongiiforme transmissível, lipídeos, proteínas e DNA. Além disso, a contaminação pode ser devida a impurezas próprias do processo de produção farmacêutica da heparina, no entanto, os métodos para controlar a ocorrência desses contaminantes já estão bem estabelecidos. Hoje, a principal preocupação são as impurezas estruturalmente relacionadas, como por exemplo, o dermatam sulfato (DS), também conhecido como condroitim B, que é um polímero formado por dissacarídeo de *N*-acetil 1,3-galactosamina ligado a um resíduo de ácido urônico por ligações 1,4 (; ROCHA *et al.*, 2004; BENI; LIMTIACO; LARIVE, 2011).

## 2.4 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGA

### 2.4.1 Considerações gerais

Existe uma tendência crescente direcionada a pesquisa de produtos naturais bioativos com aplicações na indústria farmacêutica, biomédica, cosmética e alimentícia (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2015).

O Brasil possui uma extensa costa litorânea, cerca de 8000 km, (TEIXEIRA *et al.*, 2013; PEREIRA; COSTA-LOTUFO, 2012) e uma rica flora de macroalgas marinhas, que representam potenciais fontes de interesse biotecnológico devido à produção de uma grande

diversidade de compostos, os quais exibem um largo espectro de atividades biológicas e, assim, oferecem oportunidades para bioprospecção de substâncias inexploradas.

Os principais estudos com macroalgas marinhas ocorrem com aquelas pertencentes aos filos Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas pardas,) e Rhodophyta (algas vermelhas) (CAMARA *et al.*, 2011; RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2015).

Os polissacarídeos são macromoléculas de ampla distribuição em organismos marinhos, que possuem grande importância biológica e apresentam uma enorme variedade de estruturas (LAURIENZO, 2010).

Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas têm sido reportados, entre outras, por suas atividades anti-inflamatória (MEDEIROS *et al.*, 2008; ALBUQUERQUE *et al.*, 2013), antinociceptiva (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013), anticoagulante, antioxidante (CAMARA *et al.*, 2011), antitrombótica (KWAK *et al.*, 2010), hipocolesterolêmico (HASSAN *et al.*, 2011), anticancerígena (FEDOROV *et al.*, 2013) e antiviral (WANG; WANG; GUAN, 2012).

A complexidade estrutural desses compostos é devida às muitas possibilidades de ligação entre os monossacarídeos e a distribuição de grupamentos sulfato, o que lhes confere uma configuração única (ROCHA *et al.*, 2004).

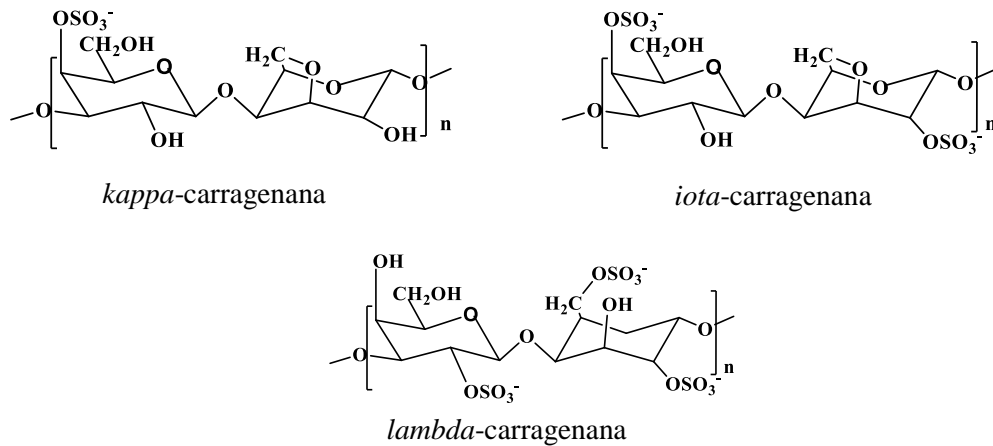
Apesar da diversidade biológica e estrutural dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, esses compostos são ainda pouco explorados e assim representam uma nova fonte, com novas perspectivas para a indústria farmacêutica (ROCHA *et al.*, 2004).

#### a) Polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas

As algas vermelhas, filo Rhodophyta, são ricas em galactanas sulfatadas, as quais tem grande importância na indústria de alimentos devido as suas propriedades como agentes gelificantes e espessantes (JIAO *et al.*, 2011). Esses polímeros consistem de cadeias lineares contendo resíduos alternados de 3- $\beta$ -galactopiranosil e 4- $\alpha$ -galactopiranosil (ou anidro-galactose piranosil) (TALARICO *et al.*, 2004). Com base na estereoquímica, as galactanas sulfatadas podem ser classificadas como agaranas e carragenanas. Esses resíduos podem ajustar-se em série L formando as chamadas agaranas ou em série D, quando são denominados carragenanas (KNUTESEN *et al.*, 1994). As carragenanas podem ser classificadas de acordo com a posição da sulfatação e a presença de anidro-galactose nas formas *kappa*, *iota* e *lambda* (LAHAYE, 2001). *kappa*-carragenana é composta por resíduos de  $\beta$ -D-galactose sulfatados na posição C-4 e por unidades de anidro-galactose (ESTEVEZ, CIANCIA, CERESO, 2000), *iota*-carragenana possui um grupo sulfato adicional na posição C-2 do resíduo de anidro-

galactose (FUNAMI *et al.*, 2007) e a *lambda*-carragenana não possui resíduos de anidrogalactose, no entanto, possui três grupos sulfato por unidade dissacarídica, sendo a terceira sulfatação na posição C-6 (Figura 6) (ZHOU *et al.*, 2004).

Figura 6 - Estrutura das unidades de repetição de algumas carragenanas



Fonte: Adaptado de Fedorov *et al.*, 2013

Amorim e colaboradores (2011) extraíram polissacarídeos sulfatos da alga vermelha *Halymenia floresia* utilizando água e precipitação com etanol. Os autores realizaram a estimativa da composição monossacarídica desses compostos, utilizando procedimento de hidrólise reductiva e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GCMS) de derivados de acetato de alditol e perceberam que os polissacarídeos apresentaram elevados teores de 6-O-metilgalactose e 3,6-anidrogalactose sulfatadas.

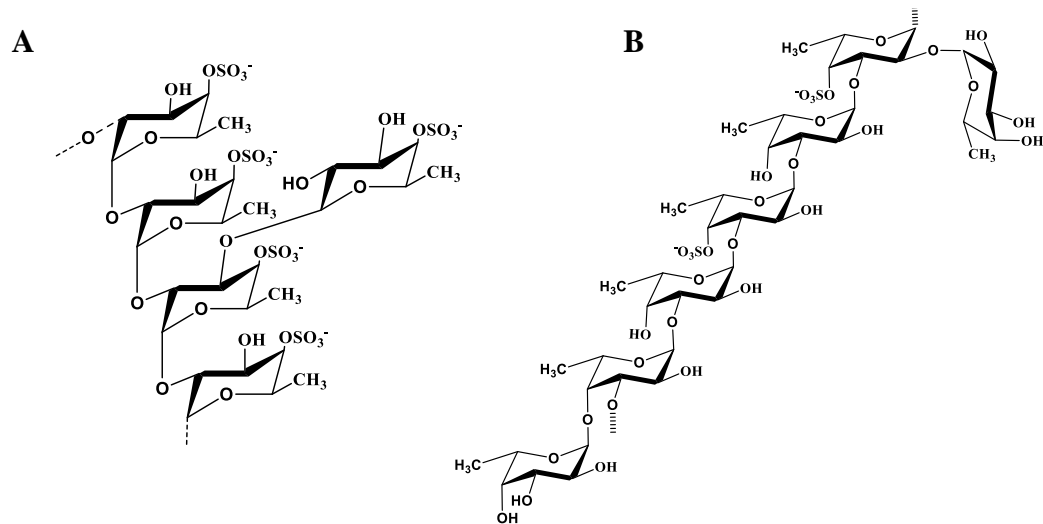
#### b) Polissacarídeos sulfatados de algas pardas

Algas marinhas pardas são ricas em heterofucanas sendo que os oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise desses compostos podem conter resíduos de galactose, glicose, ácidos urônicos, além de outros monossacarídeos que se encontram ligados a cadeia principal por diferentes tipos de ligações glicosídicas (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2015).

Fucanas são polissacarídeos sulfatados ricos em L-fucose, típicos do filo Phaeophyta, que podem formar homopolímeros, denominados homofucanas ou heteropolímeros, denominados heterofucanas (LI; LU; WEI, 2008). De acordo com Rocha e colaboradores (2005) a complexidade estrutural desses compostos torna difícil estabelecer uma relação entre a sua composição e a atividade biológica.

Polissacarídeos sulfatados obtidos de *Fucus vesiculosus* L., comercialmente disponíveis, são compostos basicamente por fucose, sulfato e cinzas. No passado Conchie e Percival (1950) e O'Neill (1954) identificaram como principal unidade componente dos polissacarídeos sulfatados de *F. vesiculosus* L. a fucose, unidas por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2), com grupamentos sulfato localizados na posição C-4 das unidades de fucose. Mais tarde, Pantankar e colaboradores (1993) sugeriram que esses polissacarídeos eram polímeros constituídos por unidades de fucose unidas por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3), com grupamento sulfato em C-4 de algumas unidades de fucose (Figura 7). As diferenças estruturais encontradas por Pantankar e colaboradores (1993) em seu trabalho foram atribuídas, principalmente, à forma de extração.

Figura 7 – Estruturas de polissacarídeos sulfatados de *F. vesiculosus* L.



Fonte: Adaptado de A-Cochie e Percival, 1950; B-Pantakar *et al.*,

Recentemente, Rodriguez-Jasso e colaboradores (2014), trabalhando com polissacarídeos extraídos de *F. vesiculosus* L., obtiveram compostos estruturalmente heterogêneos, nos quais a L-fucose é o principal monossacarídeo. Nesse estudo percebeu-se que a forma de extração interferiu na composição química dos polissacarídeos, sendo assim, na extração realizada com auxílio de ultrassom obteve-se 53,8% de fucose, 35,3 % de xilose e 10,8 % de galactose, enquanto aquela realizada com auxílio de auto hidrólise obteve-se 76,8 % de fucose e 23,2 % de galactose.

Polissacarídeos sulfatados da alga parda *Dictyota menstrualis*, extraídos por proteólise a 60°C e por fracionamento com acetona, foram submetidos a análise química após hidrólise com HCl, por HPLC com detector de índice de refração. Os resultados obtidos mostraram a presença de galactofucanas compostas de fucose, xilose, galactose, sulfato e de traços de ácido

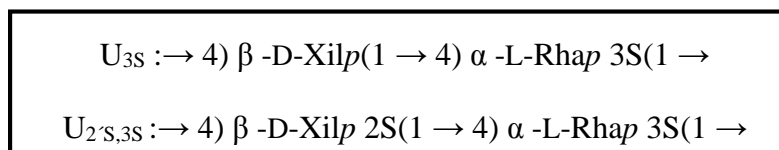
glicurônico. Por infravermelho foram obtidas bandas associadas a presença de grupos S=O, C-O-SO<sub>3</sub> e C-O-S (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

c) Polissacarídeos sulfatados de algas verdes

As algas verdes são conhecidas por sintetizar uma grande quantidade de polissacarídeos sulfatados e, recentemente, têm atraído o interesse de pesquisadores devido aos inúmeros benefícios que os mesmos podem trazer a saúde. Existe uma variedade de polissacarídeos obtidos de algas verdes, exemplo são as ramanas sulfatadas obtidas do gênero *Monostroma*, arabinogalactanas do gênero *Codium*, galactanas do gênero *Caulerpa* (WANG *et al.*, 2014) e as ulvanas, que são isoladas a partir dos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha*.

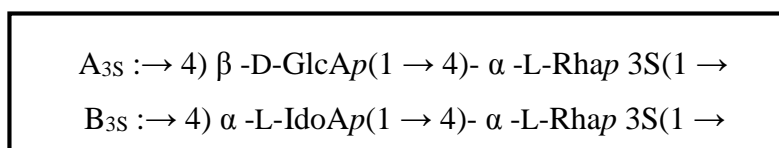
As ulvanas são os polissacarídeos mais importantes que compõem as algas da família Ulvaceae e representam uma interessante fonte a ser explorada. A composição química desses polissacarídeos sulfatados é complexa, podendo variar de acordo com a espécie, com as condições de crescimento, a origem, estações de coleta, etc. (COSTA *et al.*, 2012). Sulfato, ramnose, xilose, ácidos glicurônicos e idurônicos são os principais constituintes das ulvanas. Baixas proporções de galactose, glicose e proteínas também são geralmente encontradas em ulvanas (LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; ROBIC *et al.*, 2009).

De acordo com Lahaye e Robic (2007), as ulvanas (Figura 8) podem aparecer como estruturas composta por xilose (O-2-sulfatadas ou não sulfatadas) ligadas a resíduos de ramnose sulfatados (U<sub>3S</sub> e U<sub>2S,3S</sub>):



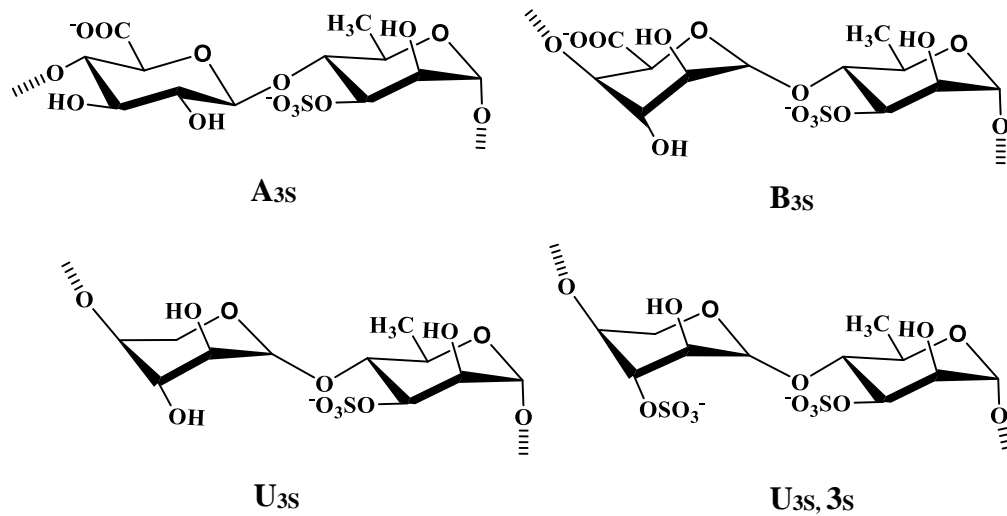
Fonte: Lahaye e Robic, 2007. *p*: indicativo da forma piranosídica do composto.

No entanto, a estrutura principal de repetição de ulvanas de diferentes espécies de *Ulva* é o ácido 3-sulfato de ulvanobiurônico, composta por O-3-ramnose sulfatada e ácido glicurônico (tipo A, A<sub>3S</sub>). Outra típica estrutura de repetição substitui o ácido glicurônico pelo ácido idurônico (tipo B, B<sub>3S</sub>):



Fonte: Lahaye e Robic, 2007. *p*: indicativo da forma piranosídica do composto.

Figura 8 – Estruturas das principais unidades de repetição das ulvanas



Fonte: Adaptado de Wang *et*

Outras estruturas de repetição de ulvanas, envolvendo os mesmos resíduos, alguns deles ramificados com ácido glicurônico também já foram relatados na literatura (LAHAYE, 1998; LAHAYE; ROBIC, 2007).

## 2.4.2 Atividades biológicas de polissacarídeos de algas marinhas

### 2.4.2.1 Atividade anticoagulante

A atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados está entre as mais estudadas, sendo responsável por extensiva exploração da medicina atual (WIJESINGHE; JEON, 2012; WANG *et al.*, 2014).

Durante a última década, polissacarídeos sulfatados bioativos isolados a partir de algas marinhas pardas têm atraído muita atenção por possuírem um amplo espectro de atividades, sendo os efeitos de modulação da coagulação (anticoagulação, antitrombose) os mais bem caracterizados (ZHU *et al.*, 2010; POMIM; MOURÃO, 2012).

Homofucanas e heterofucanas sulfatadas extraídas de várias espécies de algas pardas apresentaram diferentes efeitos sobre a coagulação. Galactofucanas extraídas de *Spatoglossum schröderi*, em concentrações entre 20-80 µg/µL, não apresentaram efeito no TTPa, enquanto as homofucanas de *Dictyota menstrualis* dobraram o tempo de coagulação no TTPa (ROCHA *et al.*, 2004). Estudos posteriores com a alga *S. schröderi* revelaram que embora as galactofucanas sulfatadas isoladas da espécie não tenham apresentado efeito anticoagulante *in*

*vitro*, possuem uma potente atividade antitrombótica, quando avaliadas em modelo animal de ligadura da veia cava, *in vivo*. Este efeito ocorre de forma tempo dependente e foi reduzido quando a molécula foi dessulfatada. Além disso, essas galactanas sulfatadas foram capazes de estimular a síntese de heparam sulfato por células endoteliais, o que justifica a atividade antitrombótica encontrada, sendo este efeito também dependente da sulfatação dos polissacarídeos (ROCHA *et al.*, 2005).

Zhu e colaboradores (2010), trabalhando com heterofucanas de baixo peso molecular, extraídas da alga marinha *Laminaria japonica* (F-Q) e com heterofucanas adquiridas comercialmente (F-S), perceberam que ambos os polissacarídeos apresentaram um efeito dose dependente no prolongamento do tempo de coagulação no teste TTPa, *in vitro*. F-Q e F-S também exibiram efeito antitrombótico, quando avaliados em ensaio antitrombótico *in vivo*, nas concentrações de 0,25, 1 e 3 mg/kg, por um modelo, no qual um tubo de polietileno siliconado contendo a amostra foi inserida na artéria carótida de ratos a partir da veia jugular. Além disso, F-Q, da mesma forma que F-S e heparina, apresentaram um efeito inibitório sobre a agregação plaquetária induzida por trombina

Polissacarídeos sulfatados ricos em fucose isolados de *F. vesiculosus* L. apresentaram um efeito dose-dependente, porém inferior ao da heparina, quando avaliados nos testes: tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), tempo de protombina (TP) e tempo de trombina (TT). Os estudos *in vivo* com o modelo de trombose da artéria carótida, induzida por cloreto férrico em ratos, no entanto, indicaram que os polissacarídeos possuíam atividade antitrombótica superior à da heparina. Considerando que as atividades anticoagulante e anti-fator Xa obtidas foram inferiores as da heparina, foi sugerido que a atividade antitrombótica apresentada está relacionada a ligação desses compostos com o cofator II (KWAK *et al.*, 2010).

Drozd e colaboradores (2011) trabalhando com heterofucanas das algas pardas *Fucus evanescens*, *Laminaria gurjanovae*, *Undaria pinnatifida*, *Laminaria japonica*, *Laminaria cichorioides* e *Costaria costata* observaram que as maiores atividades antitrombina e anti-fator X foram alcançados para as algas *F. evanescens*, *U. pinnatifida*, *L. gurjanovae* e *L. cichorioides* nas concentrações entre 30 – 50 U/mg e 10 – 20 U/mg, respectivamente. Os autores perceberam que os mecanismos anticoagulantes de ação dessas heterofucanas dependem não só da antitrombina, mas também de outros inibidores de serina proteases, como cofactor II da heparina, nexina I protease, inibidor de plasminogênio I ativado, inibidor de plasminogênio II ativado e inibidor da proteína C.

Uma fração de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga parda *Sargassum vulgare* composta de fucose, galactose, xilose, ácido glicurônico e manose prolongou o TTPa e



estimulou a atividade enzimática do fator Xa. Além disso, exibiu elevada ação antitrombótica *in vivo* na concentração de 10 µg/g, quando avaliada pelo modelo de ligadura da veia cava em ratos. Foi sugerido que esses efeitos estavam relacionados à inibição direta da trombina (DORE *et al.*, 2013).

Outras heterofucanas extraídas de diferentes algas marinhas pardas por diferentes processos de extração também apresentaram efeitos anticoagulantes sobre a via intrínseca da coagulação ao prolongar o TTPa, entre as quais heterofucanas de *Dictyopteris delicatula* (MAGALHÃES *et al.*, 2011), *Lobophara variegata* (MEDEIROS *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2015) e *Canistrocarpus cervicornis* (CAMARA *et al.*, 2011).

Zhang e colaboradores (2015) ao trabalhar com heterofucanas obtidos de diferentes algas pardas percebeu que esses compostos poderiam estimular ou inibir a coagulação do sangue *in vitro* e que a promoção da coagulação estaria relacionada com o bloqueio da via de inibição do fator tecidual.

A possibilidade de obtenção de polissacarídeos sulfatados também desperta grande interesse sobre as algas verdes. As espécies de Monostromaceae, por exemplo, mostram alta atividade anticoagulante e representam fonte potencial a ser explorada. O polissacarídeo da alga verde *Monostroma latissimum*, por exemplo, constituído principalmente de ramnose sulfatada, obteve elevada atividade anticoagulante quando avaliados por TTPa e TT (LI *et al.*, 2011).

Polissacarídeos sulfatados de algas verdes do gênero *Caulerpa*, *C. racemosa* e *C. cupressoides* quando avaliados pelo teste TTPa demonstraram baixa potencial anticoagulante quando comparados a heparina (RODRIGUES *et al.*, 2010). Por outro lado, no trabalho de Costa e colaboradores (2012a) polissacarídeos sulfatados de *C. cupressoides* exibiram atividade anticoagulante dose-dependente na via intrínseca (TTPa), e também na via extrínseca (TP). Os autores ressaltaram que além do grau de sulfatação, a atividade anticoagulante pode estar diretamente relacionada à posição do grupamento sulfato, sendo que a sulfatação na posição C-6 de resíduos de galactose dos polissacarídeos dessa alga contribuiu para atividade observada.

Polissacarídeos com elevado peso molecular (108 Da) denominados pelos autores de HEP foram obtidos a partir de extração com água de *Enteromorpha linza* e submetidos a degradação, dando origem a derivados de peso molecular mais baixo (11 Da) denominados LEP. Derivados sulfatados de LEP com elevados graus de substituição (DS) foram preparados com ácido clorosulfúrico em formamida e mostraram como principal constituição cadeias (1→4)-L-ramnose sulfatada na posição C-3. Os derivados sulfatados assim obtidos apresentaram prolongamento de TTPa e TT, mas não apresentaram atividade no teste TP, o que

sugere a inibição da via intrínseca da coagulação e formação de fibrina mediada por trombina, além de ausência de inibição da via extrínseca (WANG *et al.*, 2013).

De forma semelhante polissacarídeos extraídos da alga *Enteromorpha linza* constituídos de resíduos de ramnose (1→4)-ligados, sulfatados na posição C-3 prolongaram o TTPa (QI *et al.*, 2013) e polissacarídeos obtidos de *Enteromorpha clathrata* constituídos principalmente de resíduos de  $\beta$ -L-arabinose (1→4)-ligados, sulfatadas na posição C-3, foram capazes de prolongar efetivamente o TTPa e o TT *in vitro* (QI *et al.*, 2012).

Em trabalho de Mao e colaboradores (2006) ulvanas extraídas de *Ulva conglobata*, com alto conteúdo de ramnose, prolongaram o tempo de coagulação pela inibição direta da trombina e pela modulação do cofator II.

Da alga verde *Penicillus capitatus* foram extraídas galactanas sulfatadas que mostraram atividade anticoagulante moderada, quando avaliadas por testes de coagulação gerais e também pelo ensaio de cinética de formação de fibrina. Os resultados sugerem que um dos possíveis mecanismos envolvidos é a inibição direta da trombina, o que pode estar relacionado ao padrão de sulfatação dos polissacarídeos (ARATA *et al.*, 2015).

Galactanas sulfatadas extraídas da alga verde *Codium divaricatum* foram capazes de prolongar o tempo de coagulação quando avaliadas *in vitro* pelos testes TTPa e TT. A atividade encontrada foi atribuída a características estruturais das galactanas estudadas, sendo necessários estudos aprofundados para melhor compreensão do mecanismo de ação (LI *et al.*, 2015).

Polissacarídeos de algas vermelhas também têm atraído muita atenção por causa de suas atividades biológicas e abundante distribuição dessas algas. A atividade anticoagulante de dois principais polissacarídeos de algas vermelhas (aragana e carragenana) e de seus derivados sulfatados foi investigada e relacionada com a suas estruturas no trabalho realizado por Liang e colaboradores (2014). Os autores perceberam que a posição da sulfatação no polissacarídeo mostrou grande impacto sobre a atividade, sendo que a sulfatação na posição C-2 de 3,6-anidro- $\beta$ -D-Galp, onde *p* refere-se a galactopiranosose, exerce efeito positivo sobre a atividade (LIANG *et al.*, 2014).

Galactanas sulfatadas extraídas da alga vermelha *Amansia multifida* apresentaram propriedades anticoagulantes apenas na via intrínseca da coagulação ao prolongar o TTPa com 200  $\mu$ g, elevando o tempo de coagulação *in vitro* por mais de 240 segundos (SOUZA *et al.*, 2012). Polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Halymenia pseudofloresia* também inibiram a via intrínseca da cascata de coagulação (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Conforme já apresentado, a inibição da coagulação sanguínea pelos polissacarídeos de algas, de forma análoga ao que ocorre com a heparina, pode estar relacionada, entre outros

mecanismos, a formação de um complexo entre o heparina/polissacarídeo de origem marinha com a serpina do plasma, antitrombina III, o que por sua vez, intensifica a velocidade de ligação e inibição dessa última sobre a trombina. No entanto, polissacarídeos sulfatados obtidos a partir de organismos marinhos, com elevada atividade anticoagulante, podem não induzir essa mudança conformacional em antitrombina III (MELO *et al.*, 2012). Nesse último caso, a atividade anticoagulante de polissacáridos sulfatados pode estar relacionada a interações não específicas e de baixa afinidade entre os carboidratos altamente sulfatados e regiões básicas como as proteínas do sistema de coagulação (MOURÃO, 2015). Vale lembrar que a quantidade de sulfato, os padrões de ligação dos resíduos de monossacarídeos dentro da estrutura de um polissacarídeo, bem como a natureza da posição da sulfatação podem influenciar de diferentes formas a atividade anticoagulante (LI *et al.*, 2011), o mesmo pode ser observado em outras atividades biológicas estudadas para polissacáridos sulfatados de alga (WIJESINGHE; JEON, 2012).

#### 2.4.2.2 Atividade anti-inflamatória e imunomodulatória

Polissacarídeos de micro e macroalgas possuem várias propriedades biológicas, dentre as quais atividades anti-inflamatórias e imunomodulatórias. Essas propriedades podem se desenvolver por diferentes caminhos, dependendo do polissacarídeo em estudo e do tipo de inflamação desenvolvido (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2015).

Existem vários trabalhos que mostram a interferência dos polissacarídeos sulfatados de alga na migração das células inflamatórias, leucócitos, para os sítios de inflamação. No trabalho de Albuquerque e colaboradores (2013), por exemplo, foi demonstrado que heterofucanas de *Dictyota menstrualis* na concentração de 20,0 mg/kg, após estímulo químico, reduziram em 100% a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal e não alteraram a expressão de interleucinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, nem do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ).

Heterofucanas sulfatadas de *Sargassum vulgare*, obtidas por precipitação com acetona, apresentaram alta atividade anti-inflamatória nas concentrações (10, 30 e 50 mg/kg) testadas pelo modelo de indução de edema de pata por carragenana, sendo observadas a redução do edema e da infiltração celular (DORE *et al.*, 2013).

Em trabalho realizado por Medeiros e colaboradores (2008), heterofucanas sulfatadas de *Lobophora variegata*, extraídas por digestão enzimática, seguida de fracionamento com acetona, e homofucanas da espécie *Fucus vesiculosus* de origem comercial, foram avaliados

por um modelo de peritonite aguda induzida por injeção de tioglicolato de sódio. A análise foi realizada numa concentração de (50 mg/Kg) e os polissacarídeos reduziram os leucócitos no fluido peritoneal em 55 % e 70 %, respectivamente. Além disso, quando testados por um modelo de dermatite de contato irritante em ratos *Wistar*, esses polissacarídeos também reduziram a resposta inflamatória cutânea.

Estudos com polissacarídeos sulfatados de alga também tem mostrado a capacidade desses compostos em atuar por uma associação de efeitos anti-inflamatórios e imunomodulatórios (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2015).

Ulvanas sulfatadas de *U. rígida* induziram macrófagos murinos (RAW 264.7), aumentando a expressão de interleucina IL-6 e do receptor  $\beta$ -1 de IL-12, além disso, aumentaram a produção de NO e a secreção de PGE-2. Sendo observada uma redução desses efeitos em consequência da dessulfatação dos compostos, o que sugere que o grupo sulfato é essencial para a atividade (LEIRO *et al.*, 2007).

Polissacarídeos sulfatados ricos em ramnose extraídos com água da alga verde *Ulva pertusa* e purificados por cromatografia de troca iônica estimularam células (RAW 264.7), induzindo a produção de citocinas e óxido nítrico, o que sugeriu um efeito imunomodulador desses polissacarídeos (TABARSA; LEE; YOU, 2012).

Kang e colaboradores (2011) trabalhando com macrófagos, células (RAW 264.7) e heterofucanas obtidas de *Eckloniacava* observaram uma inibição dose-dependente da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida por LPS(iNOS) e da expressão do gene para a enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e, como consequência, uma redução na produção de óxido nítrico (NO) e de prostaglandina E2(PGE2).

Polissacarídeos extraídos da alga vermelha *Lithothamnion muelleria*, a partir de técnica que combina extração com água quente, uso de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e precipitação com etanol, além da redução da injúria animal decorrente de doença inflamatória, obteve-se uma redução dos níveis de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas pró-inflamatórias e inibição da migração e adesão leucocitária (REZENDE *et al.*, 2013).

Estudos recentes da atividade anti-inflamatória de polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Gracilaria cornea* realizados pelo modelo de indução de edema de pata por diferentes agentes revelaram, entre outros resultados, que nas concentrações de 3, 9, 27 mg/kg houve uma inibição do edema de pata induzido por carragenana e dexam, na concentração de 9 mg/kg ocorreu uma inibição do edema induzido por histamina, composto 48/48 e por L-arginina, sendo também foi percebido uma regulação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (COURA *et al.*, 2015).

Homofucanas sulfatadas de *Fucus vesiculosus* L. reduziram a expressão de TGF- $\beta$ 1 e óxido nítrico em ratos submetidos a lesão hepática induzida pela administração de álcool e em células HepG2. O tratamento com homofucanas sulfatadas nos ratos foi realizado nas doses (30 mg/kg ou 60 mg/kg) e também foi capaz de reduzir o aumento dos níveis aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, além de reduzir a produção de ciclooxigenase-2 e de aumentar a expressão da enzima hepatoprotetora, hemeoxigenase-1 (LIM *et al.*, 2015).

### 2.4.3 Polissacarídeos sulfatados de *Ulva lactuca* L.

#### 2.4.3.1 Composição química

*Ulva lactuca* L. é uma alga verde comum na divisão Chlorophyta encontrada na Europa, América do Norte e do Sul, Ilhas do Caribe, África, Ilhas do Oceano Índico, Sul-Oeste da Ásia, China, Ilhas do Pacífico, Austrália e Nova Zelândia.

Rica em muitos nutrientes importantes como fibras dietéticas, esta alga marinha apresenta a hemicelulose a mais abundante delas, seguida pela celulose e pela lignina. Além disso, é uma fonte alternativa de aminoácidos essenciais e de alguns ácidos graxos polinsaturados, como ácido oleico, linoleico e linolênico. O principal valor de *U. lactuca* L., no entanto, está na extração de compostos específicos, particularmente a fibra insolúvel e a fibra dietética solúvel, sendo a última correspondente a ulvana, um polissacarídeo sulfatado (YAICH *et al.*, 2011; YAICH, *et al.*, 2015).

Os polissacarídeos de *U. lactuca* L. são constituídos principalmente de sulfato, ramnose, xilose, glicose (HASSAN *et al.*, 2011; TIAN *et al.*, 2015; YAICH, *et al.*, 2011; ALVES; SOUZA; REIS, 2013), ácido glicurônico (HASSAN *et al.*, 2011; TIAN *et al.*, 2015; ALVES; SOUZA; REIS, 2013; SHATIVEL, 2008), podendo também conter resíduos de galactose, arabinose, manose (YAICH *et al.*, 2011; HASSAN *et al.*, 2011), ácido galacturônico (HASSAN *et al.*, 2011), ácido idurônico (LAHAYE; ROBIC, 2007; ALVES; SOUZA; REIS, 2013; QUEMENER; LAHAYE; BOBIN DUBIGEON, 1997) e baixas proporções de proteína (ROBIC *et al.*, 2009).

A glicose já foi reportada como o composto mais abundante nesta alga, tendo como origem uma extração rica em celulose e a hemicelulose. A ausência de frutose nos extratos da alga, está relacionada à ausência de sacarose e a presença de ramnose, por sua vez, pode ser atribuída a presença de xiloramínoglicuronana (YAICH *et al.*, 2011).

Embora as estruturas químicas dos polissacarídeos *U. lactuca* L. de diferentes origens sejam também diferentes, é aceita uma estrutura regular de ácidos urônicos e grupos sulfatos, além da presença de açúcares raros como ramnose e ácido idurônico (TIAN *et al.*, 2015).

Estudos químicos pioneiros com ulvanas de *U. lactuca* L. determinaram que ácido glicurônico e ramnose ocorrem principalmentena na forma de ácido aldobiourônico e 4-O- $\alpha$ -D-glucuronosil-L-ramnose, respectivamente (BRADING; GEORG-PLANT; HARDY, 1954). Ulvanas de *U. Lactuca* L. e seus oligossacarídeos, obtidos após hidrólise parcial, indicaram uma elevada proporção de  $\alpha$  - (1  $\rightarrow$  4) - unidades de ramnose ligadas que são sulfatadas na posição C-3. Além disso,  $\beta$  - (1  $\rightarrow$  4)- e  $\beta$  - (1  $\rightarrow$  3)- unidades de xilose ligadas,  $\beta$  - (1  $\rightarrow$  4) - e  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  3) - glicose ligadas e  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  4) – ácido glicurônico ligados também originam ulvanas. Outro dados mostram a presença de sulfato em xilose na posição 2 e demonstram que a maior parte dos sulfatos em ulvanas de *Ulva* spp. está localizado na posição C-3 ou C-2 de unidades ramnoses (LAHAYE; ROBIC, 2007; PERCIVAL, 1979).

Quanto às propriedades físico-químicas, existem relatos de que as fibras solúveis de *U. lactuca* L., tais como ulvanas, na presença de íons borato e de cálcio podem formar géis (LAHAYE, JEGOU; BULEON, 1994; LAHAYE; ROBIC, 2007).

Os polissacáridos insolúveis provenientes do *U. lactuca* L., por outro lado, podem formar 33% (peso seco) desta alga e tem sido usados para várias aplicações tais como fabricação de papel (LAHAYE; JEGOU; BULEON, 1994).

Além disso, polissacarídeos sulfatados extraídos de *U. lactuca* L., em meio alcalino e precipitados com etanol, foram reportados pelas suas excelentes propriedades de superfície. Essas propriedades devem-se as suas estruturas anfífilas, onde os grupamentos metil da ramnose desempenham o caráter hidrofóbico, enquanto o sulfato desempenha o caráter hidrofílico. Considerando que as propriedades de superfícies são importantes aos surfactantes, uma classe importante de compostos com propriedades emulsificantes, solubilizantes, dispersante, em muitos produtos, tais como detergentes, amaciantes, emulsões, adesivos, tintas, cosméticos, etc., associado à poluição causada por surfactantes sintetizados, os naturais estão sendo cada vez mais pesquisados. Neste aspecto, a origem natural e as propriedades de superfície de polissacarídeos de *U. lactuca* L., os torna potencialmente úteis como surfactantes em aplicações cosméticas farmacêutica e de alimentos (TIAN *et al.*, 2015).

#### 2.4.3.2 Atividades biológicas

Os polissacarídeos são os principais componentes estruturais de *U. lactuca* L. (TIAN *et al.*, 2015) e tem atraído interesse na busca de atividades biológicas.

De acordo com Shatível e colaboradores (2008) os polissacarídeos obtidos de *U. lactuca* L., denominados de ulvanas, constituem uma fibra dietética, estruturalmente semelhante aos glicosaminoglicanos de mamíferos, mas com atividades biológicas pouco exploradas.

Em trabalho realizado por Hassan e colaboradores (2011) os polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L. extraídos com água quente e precipitados com etanol foram capazes de reduzir os níveis de lipídios totais, triglicérides, colesterol total, LDL e VLDL de ratos albinos tratados com dieta hipercolesterolêmica. Esses resultados foram acompanhados por um aumento de 180% dos níveis de HDL, pelo aumento da atividade de transaminases do soro e de fosfatase alcalina e também pelo surgimento de efeitos antioxidantes benéficos às células hepáticas.

Sathível e colaboradores (2008) trabalharam com polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L. extraídos com água quente. Nesse trabalho, os polissacarídeos utilizados como pré-tratamento de ratos *Wistar* foram capazes de reduzir os efeitos hepáticos tóxicos induzidos pela administração de D-galactosamina, além disso, apresentaram propriedades anti-peroxidativa e anti-hiperlipidêmica. Foi sugerido que a presença de alguns compostos de enxofre nos polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L. seriam os responsáveis pela redução do acúmulo excessivo de triglicérides intracelulares, podendo ter a capacidade de evitar o aumento agudo dos níveis de ácidos graxos livres, de triglicérides e colesterol total no soro e no tecido.

Devaki, Shatível e Raghavendran (2009) obtiveram resultados parecidos ao estudar as mitocôndrias e a fração microssomal do fígado de ratos *Wistar* para avaliar o efeito antioxidante da administração de um extrato de polissacarídeos de *U. lactuca* L. (200 mg/kg de peso corporal, por dia, durante 21 dias). Os tecidos do fígado de ratos intoxicados com D-galactosamina apresentaram-se inchados e, além disso, observou-se perda de cristas mitocondriais. No entanto, em ratos pré-tratados com os polissacarídeos sulfatados não foram observadas anormalidades no tecido, nem nas enzimas microssomais e mitocôndrias. Os polissacarídeos mais uma vez parecem ter prevenido o estresse oxidativo induzido pela D-galactosamina.

Os polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L. apresentam uma atividade muito importante, considerando que altos níveis de colesterol no sangue contribuem para a

aterosclerose e para muitas doenças lipídicas associadas, como obesidade, ataques cardíacos, derrames e insuficiência renal (SATHIVEL *et al.*, 2008).

Margret, Kumaresan e Ravikumar (2009) em seu trabalho observaram que polissacarídeos de *U. lactuca* L. desencadearam uma redução do edema de pata induzido por carragenana em ratos numa concentração de 150 mg/ Kg, ou seja, apresentaram propriedades anti-inflamatórias.

Quanto às propriedades tóxicas, estudos anteriores mostram que ulvanas extraídas de *U. lactuca* L. com água quente e digestão enzimática não reduziram a viabilidade celular de fibroblastos (L929), sendo observado um significativo aumento da atividade metabólica dessas células nas concentrações de (0,25, 0,5 e 0,075 mg/mL) (ALVES; SOUZA; REIS, 2013). Por outro lado, ulvanas sulfatadas de baixo peso molecular e seus derivados dessulfatados obtidos de *U. lactuca* L. inibiram a proliferação e diferenciação de células Caco-2 (KAEFFER *et al.*, 1999).

El Baky, El-Baz e El-Baroty (2009) realizaram um extenso estudo com polissacarídeos extraídos de *U. lactuca* L. com água quente e com etanol 85%, onde observaram que esses compostos reduziram a viabilidade de células de adenocarcinoma (MCF-7) e de carcinoma hepatocelular (HepG2) e foram capazes reduzir os radicais livres quando avaliados pelos ensaios DPPH e ABST. Além disso, os polissacarídeos sulfatados apresentaram também atividade anticoagulante quando submetidos à determinação do tempo de coagulação total e atividade antiviral contra vírus herpes simplex tipo 1.

Polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L., extraídos com água quente, foram utilizados como pré-tratamento de camundongos infectados pelo vírus da encefalite japonesa (JEV), uma das principais causas de encefalite aguda em seres humanos, retardaram o aparecimento de paralisia no membro posterior e evitaram a morte dos animais. Os estudos revelaram que esses carboidratos podem bloquear a absorção do vírus e, assim, tornar o vírus incapaz de penetrar nas células. Além disso, podem atuar reduzindo de forma eficaz a produção de citocinas pró-inflamatória nas células infectadas, atuando na prevenção antiviral, particularmente, de flavivírus (CHIU *et al.*, 2012).

A partir da revisão apresentada percebe-se que embora seja uma alga com interessantes atividades biológicas relatadas, há uma escassez de estudos quanto as atividades anticoagulante e antitrombótica da espécie *U. lactuca* L., o que torna interessante a realização do presente trabalho. Associado a isso, a biomassa de algas do gênero *Ulva* spp., de acordo com Briand e Morand (1997), Bruhn e colaboradores (2011) e Bikker e colaboradores (2016) está amplamente disponível, sendo essas as principais algas em crescimento nas “marés verdes” de



algas, o que tem estimulado sua colheita para emprego, por exemplo, na produção de biocombustíveis. É importante destacar ainda, que o Brasil possui uma extensa costa litorânea o que torna possível e interessante a pesquisa de diferentes produtos naturais marinhos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização química parcial e avaliar as atividades anticoagulante, antitrombótica e anti-inflamatória dos polissacarídeos sulfatados obtidos da alga verde *Ulva lactuca* L.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extrair de forma seletiva os polissacarídeos sulfatados da alga verde *U. lactuca* L.;
- ✓ Analisar a composição química dos polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L.;
- ✓ Realizar a caracterização química parcial dos polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L.: determinar a composição monossacarídica (FACE e cromatografia em papel) e analisar por espectroscopia (RAMAN, IR);
- ✓ Analisar a atividade anticoagulante *in vitro* (TTPa, TP, TT, anti-fator IIa, anti-fator Xa) dos polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L.;
- ✓ Investigar a atividade antitrombótica *in vivo* dos polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L. por modelo de ligadura da veia cava inferior em ratos *Wistar*;
- ✓ Analisar o efeito *in vitro* dos polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L. em linhagem de células endoteliais de aorta de coelho (produção de NO e atividade de metaloproteinases);
- ✓ Investigar a atividade anti-inflamatória *in vitro* dos polissacarídeos sulfatados *U. lactuca* L. em linhagem de macrófagos RAW 264.7 (produção de NO e atividade de metaloproteinases);
- ✓ Comparar as atividades dos polissacarídeos sulfatados obtidos da alga verde *U. lactuca* L. e da alga parda *F. vesiculosus* L.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Equipamentos

Agitador magnético (*Phoenix*, AP56); Balança analítica (*BEL Engineering*, MARK M254A); Balança analítica (*Shimadzu*, AY 220); Balança semi-analítica (*Shimadzu*, BL3200H); Banho-maria (*Unique Ultrasonic Cleaner*, USC 2800A); Cabine de Fluxo Laminar (*Thermo Scientific* 1300 Series A<sub>2</sub>); Centrífuga 10000 rpm (*Jouan Paris*); Centrífuga 5000 rpm (*Excelsa Baby FANEN* Ltda, 208N); Centrífuga 4000 rpm (*Centribio*); Coagulômetro (*Helena Laboratories, Company, Cascade-M*); Estufa de secagem (FANEM, 315 5E); Espectrofotômetro (*Biospectro* SP-22); Fonte de eletroforese (*Isco Electrophoresis Power Supply*, 494); Freezer -20°C (*Intelligent Bosch* 32); Freezer -80°C (*Thermo Scientific*); Incubadora de CO<sub>2</sub> umidificada (*Thermo Scientific Forma Series II Water Jacket*); Infravermelho (*FT-IR-Fourier-transforminfrared*); Leitor de placas (*Thermo Scientific Multiskan* 60); Leitor de Fluorometria/colorimetria (*Thermo Scientific*); pHmetro (*TecNow*, AB-7); Raman (*Bruker* RFS 100); Sistema de eletroforese vertical (*Mini- PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell*); Unidade filtrante (*Millipore*); Placas de cultura (TTP); Transluminador UV (Câmara *scientific grade CCD GelCam 310 – GelDoc-It Imaging System*);

#### 4.1.2 Reagentes

Acetona PA (*Biotec*); Ácido acético (*Synth*); Ácido bórico (Dinâmica química contemporânea Ltda); Ácido butírico (*Vetec*); Ácido clorídrico (*Vetec*); Ácido sulfúrico (*Vetec*); Acrilamida (*Ludwig Biotec*); Agarose (*Biorad*); 2-aminoacridona – AMAC (*Sigma*); Azul de toluidina (*Vetec*); Bisacrilamida (*Neon*); Brometo de Cetiltrimetilamônio – CETAVLON (*Vetec*); Brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil (*Sigma*); Carbazol (*Sigma*); Cetamina (*Vetnil*); Cianoboroidreto de sódio (*Sigma*); Cloreto de bário (*Synth*); Cloreto de cálcio (*Vetec*); Cloreto de sódio (Proquímios); Cloreto de Zinco (*Vetec*); *Commassie Brilliant Blue* (*Vetec*); Dimetilsufóxido – DMSO (*Vetec*); Dodecil sulfato de sódio – SDS (*Vetec*); EDTA (Dinâmica química contemporânea Ltda); Enzima alcalase (*Sigma*); Estreptomicina (*Gibco by Life*); Etanol etílico (Êxido Científica); Fenol (*Alphatec*); Gelatina

(Difco); Glicerina (Cromato Produtos Químicos Ltda); Glicina (*Sigma*); Hidróxido de amônio (*Vetec*); Hidróxido de sódio (*Alphatec*); Kit BCA (*Thermo Scientific*); Kits ELISA (R&D Systems); Kits TTPa, TP, TT (*Labtest*); Kits IIa e Xa (*American Diagnóstica – Actichrome®Heparinanti-fXa e Actichrome®Heparinanti-fIIa, Greenwich, CT, USA*); Lipopolissacarídeo (*Sigma*); Meio de cultura Dubelcco modificado - DMEM (*Cultilab*); Meio de cultura F12 (*Cultilab*); *N*-[1-naftil]-etilenodiamina (*Sigma*); Nitrato de prata (*Vetec*); Nitrito de sódio (*Sigma*); Padrões – condroitim sulfato, dextram sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato, fucose, albumina, fucose, glicose, galactose, ramnose, ácido glicurônico, ácido galacturônico, manose e xilose (*Sigma*); Penicilina (*Gibco by Life*); Persulfato de amônio (*Vetec*); Soro Fetal Bovino (*Cultilab*); Sulfato de sódio (*Impex*); Sulfanilamida (*Sigma*); Tetraborato de sódio (*Impex*); Tetrametiletlenodiamina (*Sigma*); Tripsina (*Cultilab*); Tris base (*Biosolve*); Triton X-100 (*Vetec*); Vermelho de cresol (*Vetec*); Xilazina (*Ceva*).

#### 4.1.3 Algas marinhas

##### a) *Ulva lactuca* L.

A alga marinha verde, *Ulva lactuca* L. (Figura 9), foi coletada no período de maré baixa entre 0,0 - 0,2 metros, a uma temperatura entre 28-30°C, na praia Búzios pertencente ao município de Nísia Floresta no litoral sul do Rio Grande do Norte, que está localizada a 23 Km de Natal. Após coleta, a alga foi lavada em água corrente e examinada para remoção de epífitas e inclusões calcárias. Em seguida, a alga foi seca em estufa a 40°C, triturada e o pó obtido foi pesado e acondicionado em frasco adequado para posterior extração dos polissacarídeos sulfatados. A identificação da referida alga foi realizada pelo Prof.º Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha (Departamento de Bioquímica - UFRN), sendo sua classificação taxinômica apresentada a seguir.

Figura 9- Alga marinha verde *Ulva lactuca* L.



Fonte: foto retirada do site “The seaweed site: information on marine algae”

**Domínio taxonômico:** Eukaryota

**Reino:** Plantae

**Filo:** Chlorophyta

**Classe:** Ulvophyceae

**Ordem:** Ulvales

**Família:** Ulvaceae

**Gênero:** Ulva

**Espécie:** *Ulva lactuca* L.

b) *Fucus vesiculosus* L.

A alga marinha parda *Fucus vesiculosus* L. (Figura 10), utilizada no presente estudo, foi obtida comercialmente, juntamente com certificado de análise do controle de qualidade (Anexo I) da empresa *Fagron SM Empreendimentos Farmacêuticos Ltda*, seca ao sol e triturada na forma de pó, que foi utilizado para a extração dos polissacarídeos sulfatados.

A referida alga apresenta a seguinte classificação taxonômica.

Figura 10- Alga marinha parda *Fucus vesiculosus* L.



Fonte: foto retirada do site “The seaweed site: information on marine algae”

**Domínio taxonômico:** Eukaryota

**Reino:** Chromista

**Filo:** Ochrophyta

**Classe:** Phaeophyceae

**Subclasse:** Fucophycidae

**Ordem:** Fucales

**Família:** Fucaceae

**Gênero:** Fucus

**Espécie:** *Fucus vesiculosus* L.

#### 4.1.4 Linhagens Celulares

As linhagens celulares de macrófago murino (RAW 264.7), obtidas da *American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)* (RASCHKE, 1978) e de endotélio de aorta de coelho (RAEC), obtidas do laboratório de Biologia Molecular, UNIFESP/EPM (COLBURN; BUONASSISI, 1982), foram cultivadas em meio Dulbecco modificado – DMEM e em meio F12, respectivamente, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). As células foram mantidas a 37°C em incubadora umidificada e sob tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. A troca do meio de cultura para manutenção das células foi realizada a cada 3 dias.

#### 4.1.5 Animais

O modelo de trombose venosa *in vivo* foi realizado em ratos machos da linhagem *Wistar*, pesando cerca de 180-200g, obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em gaiolas, submetidos à água e dieta *ad libitum* em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e a temperatura constante de 25°C.

Os animais foram acondicionados no laboratório no mínimo por 3 dias antes da realização do experimento. Após experimento, os animais foram sacrificados por exsanguinação cardíaca seguida de ruptura do diafragma. A realização do experimento envolvendo animais se encontra aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFJF, sob o Protocolo n° 037/2014 (Anexo II).

## 4.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

### 4.2.1 Obtenção do pó cetônico

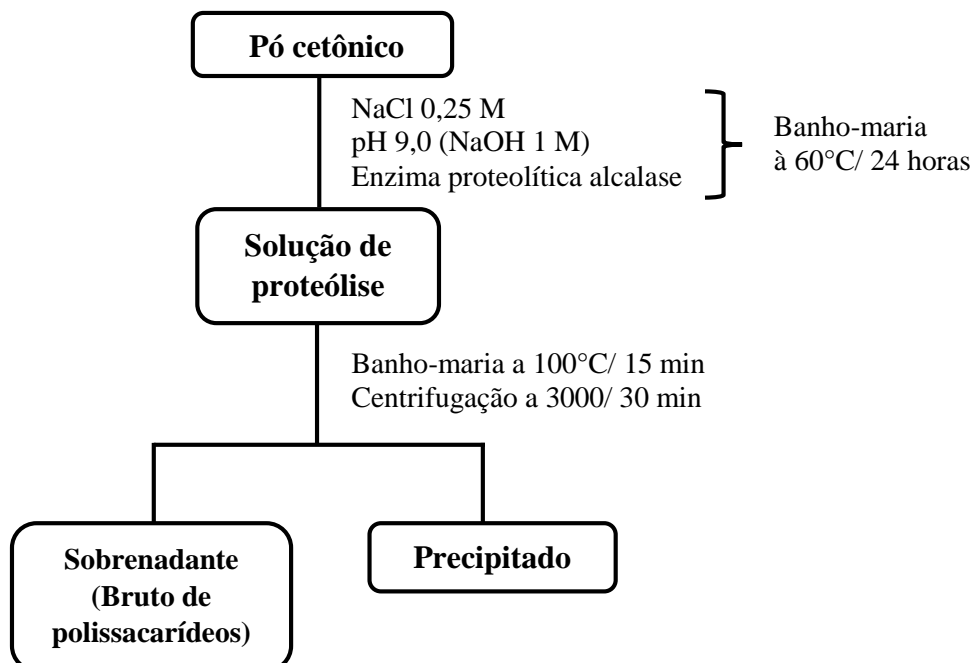
Cerca de 35g da alga verde, *Ulva lactuca* L., seca e pulverizada, foi suspensa com 2 volumes de acetona PA para despigmentação e delipidação. Essa solução foi deixada em repouso por 12 horas a temperatura ambiente. Após esse período, o material foi decantado e o procedimento repetido por duas vezes para completa remoção do pigmento. O resíduo obtido, denominado pó cetônico de *U. lactuca* L., foi seco a temperatura ambiente, pesado e utilizado para posterior proteólise.

Para obtenção do pó cetônico de *F. vesiculosus* L. cerca de 50g da alga seca, obtida comercialmente, foi submetida ao processo de despigmentação e delipidação, semelhante ao realizado para a alga *U. lactuca* L. (ROCHA *et al.*, 2005).

#### 4.2.2 Proteólise

Para realização desta etapa (Figura 11), foram adicionados ao pó cetônico (cerca de 34,49 g de *U. lactuca* L. e 49,83g para *F. vesiculosus* L.) oito volumes de NaCl 0,25 M, sendo o pH da solução ajustado para 9,0 com NaOH 1M. Ao material, foram adicionadas respectivamente 350  $\mu$ L e 500  $\mu$ L da enzima proteolítica alcalase, uma protease de *Streptomyces griseus* (Sigma, P5147), com atividade de  $\geq 3,5$  unidades/mg, pH 5-9,0, sendo o pico de atividade em pH8,8, com especificidade ampla de substratos, que pode ser mediada por um sítio ativo composto por resíduos de ácido aspártico, histidina e serina, preferindo hidrolisar ligações peptídicas no lado carboxílico do ácido aspártico.

Figura 11 - Esquema do processo de extração dos polissacarídeos sulfatados das algas *Ulva lactuca* L. e *Fucus vesiculosus* L.



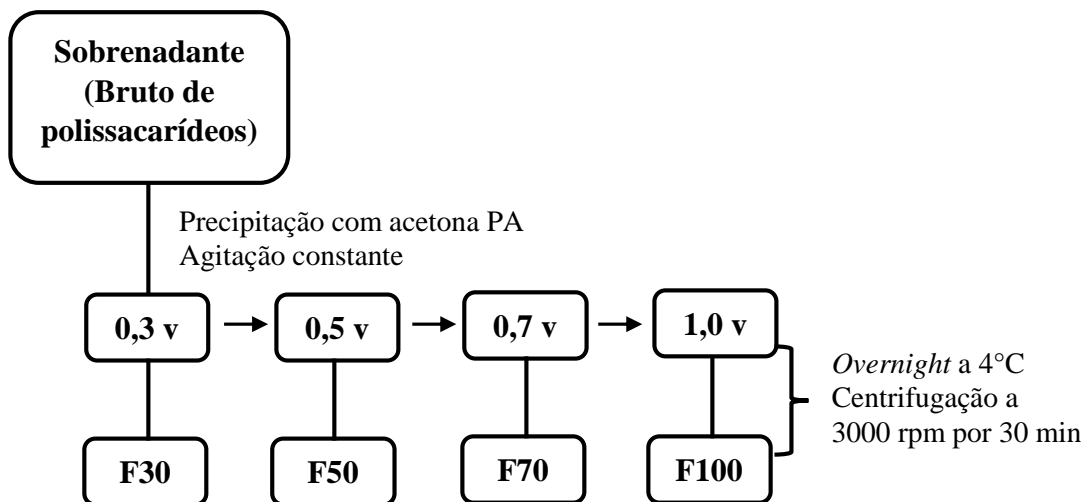
O pó cetônico (cerca de 34,49g de *U. lactuca* L. e 49,83g para *F. vesiculosus* L.) obtido após delipidação foi incubado à 60°C com enzima alcalase para proteólise. O material dessa proteólise foi centrifugado a 3000 rpm por 30 min e o sobrenadante correspondente ao bruto de polissacarídeos separado. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A suspensão proteolítica, anteriormente preparada, permaneceu em banho-maria a 60°C durante 24 horas, sem agitação. Após esse período, o material foi submetido à inativação enzimática em banho de água fervente a 100°C por 15 minutos. Em seguida o material foi resfriado, filtrado em gaze e centrifugado a 3000 rpm por 30 min. Após centrifugação, o sobrenadante que contém os polissacarídeos foi denominado “extrato bruto de polissacarídeos” e submetido a fracionamento com acetona PA.

#### 4.2.3 Fracionamento dos extratos brutos com acetona PA

O sobrenadante obtido, após proteólise de cada alga, foi medido e submetido a fracionamento com volumes crescentes de acetona PA (0,3v; 0,5v; 0,7v e 1,0v). Os sobrenadantes foram precipitados com acetona PA sobre agitação constante e deixados a temperatura de 4°C, *overnight*. Após esse período, o material foi centrifugado, o sobrenadante foi medido e utilizado para nova precipitação com acetona PA. Os precipitados obtidos foram submetidos a secagem a pressão reduzida, pesados, e denominadas F30UI, F50UI, F70UI e F100UI para *U. lactuca* L. e F30Fv, F50Fv, F70Fv e F100Fv para *F. vesiculosus* L. (Figura 12).

Figura 12 – Esquema do fracionamento do extrato bruto de polissacarídeos com volumes crescentes de acetona PA



O bruto de polissacarídeos obtido após proteólise foi medido e precipitado com 0,3 volumes de acetona PA, deixado *overnight* a 4°C e centrifugado a 3000 rpm por 30 min. O precipitado obtido denominado F30Fv e F30UI para *F. vesiculosus* L. e *U. lactuca* L., respectivamente. O novo sobrenadante foi precipitado com 0,5 volumes de acetona PA e assim sucessivamente até 1,0 volume de acetona PA. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR



#### 4.2.4 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada segundo Dietrich e Dietrich (1976). A agarose foi preparada na concentração de 0,5 % em tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA) 0,05M, pH 9,0 e colocada sobre lâminas de vidro, medindo 7,5 x 5,0 x 0,2. Cerca de 5 $\mu$ L de cada fração de polissacarídeo sulfatado obtido foi aplicado, utilizando as seguintes massas: F30UI (250  $\mu$ g), F50UI (50  $\mu$ g), F70UI (50  $\mu$ g), F100UI (150  $\mu$ g), F30Fv (100  $\mu$ g), F50Fv (25  $\mu$ g), F70Fv (25  $\mu$ g) e F100Fv (250  $\mu$ g). Como padrão foi utilizado uma mistura de glicosaminoglicanos, contendo condroitim sulfato, dermatam sulfato e heparam sulfato (5  $\mu$ g de cada um dos padrões).

As amostras foram submetidas à corrente contínua de 100 V, em câmara refrigerada a 4°C, durante aproximadamente uma hora. Após a corrida eletroforética, os compostos foram precipitados com solução de brometo de Cetiltrimetilamônio (CETAVLON) 0,1%, por no mínimo duas horas, a temperatura ambiente. As lâminas foram então secas em corrente de ar quente e coradas com azul de toluidina 0,1 % em solução de ácido acético 1 % e etanol 50 %, por 20 minutos. O excesso de corante foi removido com solução de ácido acético 1 % e etanol 50 % (solução descorante). A revelação dos polissacarídeos foi realizada pela capacidade do azul de toluidina interagir com o sulfato presente nas amostras. Compostos ricos em sulfato desenvolvem uma coloração azul-violácea característica.

#### 4.2.5 Análise do peso molecular

A determinação do peso molecular foi realizada em gel de agarose 1,5% de acordo com Bhilocha e colaboradores (2011) com modificações. A agarose foi preparada na concentração de 1,5 % em tampão TBE (Tris 100 mM, ácido bórico 100 mM e EDTA 1 mM), pH 8,3 em sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell com lâminas de 7,2 cm e espaçadores de 1,50 mm. Como padrões foram usados dextram sulfato (8KDa), condroitim sulfato (26KDa) e condroitim sulfato (67KDa). As amostras (100  $\mu$ g) e padrões (5  $\mu$ g) foram secos à vácuo e ressuspensos em 5  $\mu$ L de tampão de amostra (Tris 40 mM, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM, glicerol 40%, vermelho de cresol 0,05%) e aplicados no gel de agarose a 1,5 %. A corrida eletroforética foi realizada em câmara refrigerada a 4°C e tampão de corrida TBE. As amostras foram submetidas à corrente contínua de 20 V nos 30 minutos iniciais e de 40 V por mais 3 horas e 30 minutos. Após o tempo de corrida, os géis foram removidos das lâminas e corados com azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1%, por 30 minutos. O excesso de corante foi

removido com solução de ácido acético 1%, e o gel digitalizado e submetido à análise de fator de retenção pelo programa *TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltd.)*.

### 4.3 ANÁLISES QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

#### 4.3.1 Dosagem de açúcares totais

A dosagem de açúcares totais das frações polissacarídicas foi realizada pelo método fenol/ácido sulfúrico de acordo com Dubois e colaboradores (1956), empregando-se uma curva padrão de L- fucose, sendo a leitura realizada a 490 nm em espectrofotômetro.

#### 4.3.2 Dosagem de sulfato

O teor de sulfato das frações polissacarídicas extraídas das algas foi determinado por turbidimetria pelo método gelatina-bário proposto por Dodgson (1961). As amostras foram submetidas inicialmente a hidrólise ácida (HCl 8 M, 6 horas, 100°C) e neutralizados por evaporação à vácuo na presença de NaOH. A leitura da absorbância foi realizada à 500 nm em espectrofotômetro e os valores de sulfato calculados a partir de uma curva de calibração de sulfato de sódio.

#### 4.3.3 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando o reagente de *Coomassie Brilliant Blue*. Para a curva padrão utilizou-se albumina sérica bovina e a leitura foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro.

#### 4.3.4 Dosagem de ácido urônico

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada segundo o método de Di Ferrante e colaboradores (1971), utilizando o reagente borato (tetraborato de sódio 0,4%, em ácido sulfúrico) e o reagente carbazol 0,1 % em etanol. A leitura das absorbâncias das amostras foi realizada a 525 nm e os valores de ácidos urônicos estimados a partir de uma curva padrão de ácido D-glicurônico.

### 4.3.5 Análise da composição monossacarídica das frações cetônicas

#### 4.3.5.1 *Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis* (FACE)

A análise da composição monossacarídica das frações obtidas das algas marinhas investigadas foi realizada por *Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis* (FACE) de acordo com Cunha e colaboradores (2015). As amostras foram hidrolisadas, derivatizadas, submetidas à corrida eletroforética e reveladas em câmara de UV 365 nm.

##### a) Preparo das amostras

As frações (F50UI, F70UI, F50Fv e F70Fv) e os padrões de monossacarídeos (glicose, galactose, fucose, ramnose, ácido galacturônico e ácido glicurônico) foram submetidos a hidrólise (HCl 6M, 6 horas, 100 °C) e neutralizados por evaporação à vácuo na presença de NaOH. Após hidrólise, preparou-se soluções das amostras e dos padrões. Para derivatização, 80 µg das amostras (F50UI, F50Fv), 40 µg das amostras (F70UI, F70Fv) e 2 µg de cada um dos padrões foram secas à vácuo. Posteriormente, os padrões foram ressuspensos com 5 µL de 2-aminoacridona (AMAC) 20 mmol em DMSO:ácido acético (85:15), enquanto as amostras com 5 µL de AMAC 50 mmol em DMSO:ácido acético (85:15). Após 15 minutos, em temperatura ambiente, foram adicionados 5 µL de solução de cianoboroidreto de sódio 1 M, recentemente preparada. Essa mistura de derivatização foi incubada a 37°C por 16 horas, quando então foi adicionado 5 µL de glicerol 60 %.

##### b) Preparo dos géis

Foram preparados géis de acrilamida-bisacrilamida 25%, em sistema-tampão Tris-borato e a corrida foi realizada com tampão contendo Tris-borato-glicina pH 8,3. Para o sistema Tris-borato, foram feitas soluções para dois géis. Os géis de corrida foram preparados a partir 6,25 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida T 40%, C 5 %; 2,5 mL de tampão Tris-borato (0,75 M/ 0,5 M), pH 7,0 e 1,25 mL de água destilada. Os géis de entrada foram preparados a partir de 2,20 mL de solução de acrilamida-bisacrilamida T 10 %, C 25 %; 1,0 mL de tampão Tris-borato (0,5 M/ 0,5 M), pH 6,8 e 0,8 mL de água destilada. A polimerização dos géis de corrida foi iniciada após adição de 70 µL de solução de persulfato de amônio 10 % (APS) e 7 µL de *N, N, N', N'*-tetrametiletlenodiamina (TEMED) e dos géis de

entrada após adição de 50  $\mu\text{L}$  de APS e 10  $\mu\text{L}$  de TEMED. Pentes contendo 10 poços de 0,5 cm foram inseridos nos géis, após a polimerização completa dos géis, os pentes foram retirados para aplicação dos padrões e amostras.

c) Corrida eletroforética

A FACE foi realizada em sistema de eletroforese vertical *Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell* com lâminas de 7,2 cm e espaçadores de 0,75 mm. Como tampão de corrida foi utilizado o tampão Tris-borato-glicina (0,6 M / 0,5 M / 0,5 M), pH 8,3. Para eletroforese, adicionou-se ao anodo 160 mL do tampão de corrida diluído [1X] em água destilada a 4°C. Após remoção dos pentes, alíquotas de 2  $\mu\text{L}$  das misturas derivatizadas foram aplicados no gel e adicionou-se ao catodo, aproximadamente, 500 mL de tampão de corrida diluído [1X] a 4°C. A eletroforese foi então submetida a uma diferença de potencial de 100 V nos primeiros 20 minutos da corrida, quando a diferença de potencial foi aumentada para 250 V. A migração dos polissacarídeos foi acompanhada utilizando-se luz UV 320 – 400 nm (luz negra). Finalizada a corrida eletroforética, as placas foram lavadas com água destilada e reveladas, utilizando-se diferentes tempos de exposição, em um transluminador UV com filtro UV em 365 nm e Câmara *scientific grade CCD GelCam 310 – GelDoc-It Imaging System*. A análise densitométrica foi realizada utilizando-se o programa *TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltd)*.

#### 4.3.5.2 Cromatografia Descendente em Papel

A análise da composição monossacarídica das frações de polissacarídeos sulfatados das algas estudadas também foi realizada pela técnica de cromatografia descendente em papel. As frações (F50UI, F70UI, F50Fv e F70Fv) e os padrões de monossacarídeos (manose, xilose, glicose, galactose, fucose, ramnose, ácido galacturônico e ácido glicurônico) foram submetidos a hidrólise (HCl 6M, 6 horas, 100 °C) e neutralizados por evaporação à vácuo na presença de NaOH.

Soluções dos padrões e das amostras hidrolisadas foram preparadas em água destilada. Alíquotas dessas soluções correspondentes a 10  $\mu\text{g}$  dos padrões, 250  $\mu\text{g}$  (F50UI e F70UI) e 100  $\mu\text{g}$  (F50Fv e F70Fv) foram aplicadas em papel do tipo Whatman n°1. A corrida cromatográfica foi realizada em cuba de vidro, como eluente foi utilizado o sistema ácido butírico: hidróxido de amônio 1,25M (5:3 v/v). Após 18 horas de corrida, o cromatograma foi seco em estufa com

aquecimento e circulação de ar. A revelação dos produtos redutores foi realizada com as soluções de hidróxido de sódio 10M e etanol (1:20) e nitrato de prata: acetona (1:200) (TREVELYAN, PORCTER, HARISSON, 1950). O cromatograma foi seco após revelação e a análise do fator de retenção (Rf) de cada monossacarídeo foi determinada com auxílio do programa *TotalLab TL120 1D v 2009 (Nonlinear Dynamics Ltd)*.

#### **4.3.6 Espectroscopia Raman**

Os espectros de Raman para as amostras e padrões foram obtidos a partir de análise espectral realizada a 1000 scans no instrumento *Bruker RFS 100*, operando a 1064 nm, potência de laser de 100 mW e realizando uma varredura de 4000 a 500 número de onda ( $4 \text{ cm}^{-1}$ ). A execução desta análise foi realizada no Núcleo de Espectroscopia do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

#### **4.3.7 Espectroscopia Infravermelho**

Foi realizada análise por espectroscopia de infravermelho (*FT-IR - Fourier-transform infrared*) das frações F50UI, F70UI, F50Fv e F70Fv com auxílio de um aparelho *Burker Alpha FT-IR*, na região espectral  $4000\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , utilizando a técnica de reflexão total atenuada (ATR) de medição. A execução desta análise também foi realizada no Núcleo de Espectroscopia do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

### **4.4 ANÁLISES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS**

#### **4.4.1 Atividades anticoagulantes *in vitro***

##### a) Atividade anticoagulante total - Método USP (1965)

Inicialmente, as amostras e o padrão de heparina (165 UI) foram adicionados em tubos de vidro e secas a vácuo. Depois de secas, as amostras foram ressuspensas em NaCl 0,9 %. O plasma foi então adicionado e os tubos foram incubados por 3 minutos a  $37^\circ \text{C}$ . Após esse tempo, foi adicionado o  $\text{CaCl}_2$ , para ativação da cascata da coagulação e os tubos, novamente,

incubados a 37 ° C. A observação da retração do coágulo foi realizada uma hora depois, como controle negativo foi utilizado o plasma citratado.

b) Atividade anticoagulante – Ensaios TTPa, TP e TT

Os ensaios - tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa), tempo de protrombina (TP) e tempo de trombina (TT) - foram realizados conforme protocolos dos *kits* adquiridos comercialmente (*Labtest*) utilizando plasma citratado. O tempo de coagulação foi determinado em coagulômetro Cascade-M (*Helena Laboratories Company*), sendo o tempo máximo dos testes de 180 segundos. Como controle negativo, foi utilizado o plasma citratado e como controle positivo heparina (165UI).

c) Análise da atividade anti-Xa e anti-IIa

A atividade de anti-Xa e anti-IIa foram realizadas através de métodos cromogênicos, utilizando *kits* da empresa *American Diagnóstica*. Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, conforme protocolos dos *kits* comerciais. A heparina (165UI) foi utilizada como padrão e as leituras foram realizadas à 405 nm em leitor de fluorimetria/colorimetria.

#### 4.4.2 Atividade antitrombótica *in vivo*

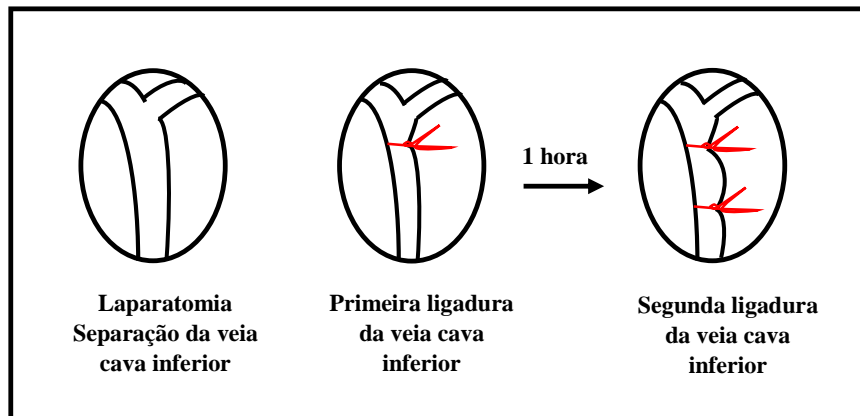
Os animais foram divididos em grupos (n = 5) e submetidos ao modelo de ligadura da veia cava inferior, de acordo com trabalhos anteriores (REYERS *et al.*, 1980; ROCHA *et al.*, 2005; BARROSO *et al.*, 2008; DORE *et al.*, 2013).

Os polissacarídeos foram dissolvidos nas concentrações de teste em solução salina (NaCl 0,9% p/v) no momento prévio a administração e filtrados em uma unidade filtrante de 0,22µm da *Millipore*.

A substância teste foi então aplicada na veia caudal, sendo o volume de 200µL. Aos tempos de 1, 3, 5, 7 e 23 horas após a aplicação intravenosa (veia caudal) dos polissacarídeos em estudo, sob efeito de anestesia (Cetamina 90 mg/Kg e Xilazina 10 mg/Kg), foi realizada laparotomia 2 centímetros abaixo do processo xifoide dos animais. A porção da veia cava inferior foi exposta cerca de 1 cm abaixo da veia renal esquerda e uma ligadura com um fio de algodão foi realizada na veia cava inferior, distalmente ao ponto de origem da veia renal

esquerda. A cavidade abdominal foi fechada com a sutura do peritônio e das camadas musculares, assim como da pele dos animais com pontos simples (Nylon 4.0). Decorrido uma hora do procedimento cirúrgico (totalizando 2, 4, 6, 8 e 24 horas de experimento) sobre efeito anestésico a cavidade dos indivíduos foi novamente aberta e uma nova ligadura foi realizada um centímetro abaixo da primeira (Figura 13).

Figura 13 – Esquema ilustrativo do procedimento de ligadura da veia cava inferior



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os animais foram então submetidos à exsanguinação sobre efeito anestésico e ruptura do diafragma. Após eutanásia o fragmento da veia cava entre as duas ligaduras foi seccionado, removido e colocado numa placa de Petri. Qualquer trombo formado foi removido lavado com solução salina, colocado em papel de filtro previamente seco e tarado. O papel de filtro contendo o trombo foi então seco por 12 horas a vácuo e novamente pesado, sendo a diferença entre as pesagens correspondente ao peso do trombo formado.

As frações polissacarídicas (F50U1, F70U1, F50Fv e F70Fv) foram inicialmente testadas na concentração de 20 µg/g por 24 horas de tratamento. A partir do teste inicial selecionou-se a melhor fração de *U. lactuca* L. para realização de uma curva de dose resposta em 24 horas nas concentrações 2, 5, 10, 15 e 20 µg/g e uma curva de tempo resposta (2, 4, 8, 12 e 24 horas) na concentração que obteve melhor resultado no teste anterior. A heparina foi utilizada como controle positivo na concentração de 1,5 µg/g (2 horas de ação) e os animais usados como controle negativo foram submetidos a cirurgia para ligadura da veia cava inferior em ausência de administração intravenosa prévia da substância teste e de heparina.

#### 4.4.3 Ensaio de viabilidade celular *in vitro*

O teste de viabilidade celular foi realizado após incubação dos polissacarídeos sulfatados e da heparina em cultura de macrófagos murinos-RAW 264.7 e células endoteliais de aorta de coelho-RAEC ( $1 \times 10^4$  células/poço). Em placas de 96 poços as células RAW 264.7 e RAEC foram incubadas com as amostras (100 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) por 44 e 20 horas, respectivamente, quando então foi adicionado o sal de tetrazólio MTT (brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil) e novamente incubadas por mais 4 horas. A viabilidade celular foi medida pela conversão do sal de tetrazólio (amarelo) em cristais de formazam (azul), que foram ressuspensos em DMSO para análise em leitor de microplacas a 492 nm (MOSMANN, 1983).

#### 4.4.4 Dosagem de óxido nítrico

A quantidade de nitrito presente no meio de cultura, após incubação com os polissacarídeos sulfatos das algas e da heparina, foi mensurada como um indicador de produção de óxido nítrico (NO) por meio da reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982).

##### a) Dosagem de NO em cultura de macrófagos murinos - RAW 264.7

Células RAW 264.7 foram cultivadas em placa de 96 poços na concentração de  $8 \times 10^4$  células/poço em meio DMEM. Após incubação por 24 horas, o meio de cultura foi trocado por meio contendo ou não lipopolissacarídeo (LPS) ( $1\mu\text{g/ml}$ ) com diferentes concentrações das amostras (50  $\mu\text{g}$  e 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e as células permaneceram por mais 48 horas em incubação  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{O}_2$ .

Após 48 horas, o sobrenadante da cultura de células foi coletado, acondicionado em gelo, para realização da dosagem de nitrito, 100  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foi misturado com volumes iguais do reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% de *N*-[1-naftil]-etilenodiamina) por 10 minutos a temperatura ambiente. A concentração de nitrito foi determinada pela medida de absorbância em 540 nm e comparada com uma curva padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ).



b) Dosagem de NO em cultura de células endoteliais de aorta de coelho - RAEC

Células endoteliais de aorta de coelho foram cultivadas em placa de 96 poços na concentração de  $3,5 \times 10^4$  células/poço em meio F12. Após incubação por 72 horas, o meio de cultura foi trocado por meio contendo ou não diferentes concentrações das amostras (25, 50 e 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e as células permaneceram por diferentes tempos (2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas) em incubação  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{O}_2$ .

Decorridas 24 horas, o sobrenadante da cultura de células foi coletado, acondicionado em gelo, para realização da dosagem de nitrito de forma semelhante a anteriormente descrita para a linhagem RAW 264.7.

#### **4.4.5 Dosagem de Interleucinas (TNF- $\alpha$ e IL-6) em cultura de macrófagos murinos RAW 264.7**

Para determinação dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL 6 secretados, células RAW 264.7 foram cultivadas em placa de 96 poços na concentração de  $8 \times 10^4$  células/poço em meio DMEM/SFB. Após cultivo de 24 horas, o meio de cultura foi substituído e as células foram tratadas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e com diferentes concentrações dos polissacarídeos sulfatados (100  $\mu\text{g}$  e 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) diluídos em DMEM. Após 48 horas de incubação  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{O}_2$ , o sobrenadante da cultura de células foi coletado e armazenada a  $-80^\circ\text{C}$  para análises posteriores. A concentração de TNF- $\alpha$  e IL 6 foi determinada por *Kits* ELISA (R&D *Systems*), de acordo com os procedimentos descritos pelos fabricantes.

#### **4.4.6 Dosagem da atividade de Metaloproteinases**

a) Para a linhagem de macrófagos murinos - RAW 264.7

Para avaliação da atividade de MMP-2 e MMP-9, células RAW 264.7 foram cultivadas em placa de P35 na concentração de  $20 \times 10^4$  células em meio DMEM/SFB. Após cultivo de 24 horas, o meio de cultura foi substituído e as células foram tratadas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e com os polissacarídeos sulfatados (100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) por 24 horas de incubação  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{O}_2$ , o sobrenadante da cultura de células foi coletado e armazenado a  $-80^\circ\text{C}$  para análises posteriores.

As atividades de MMP-2 e MMP-9 foram determinadas por zimografia. Os sobrenadantes foram submetidos à corrida usando géis de acrilamida-bisacrilamida 7,5 %,

contendo gelatina 2%, em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS PAGE). A corrida foi realizada em sistema de eletroforese vertical *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* com lâminas de 7,2 cm e espaçadores de 1,5 mm. Como tampão de corrida foi utilizado Tris-glicina-SDS (0,25M/1,92M/0,03M), pH 8,3. Após eletroforese, os géis foram lavados com Triton X-100 (2,0%, 2 vezes de 15 minutos) e incubados com a 37°C *overnight* com tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo CaCl<sub>2</sub> 10mM e ZnCl<sub>2</sub> 1 µM. Os géis foram então corados com *Coomassie blue* e as MMPs foram detectadas como bandas transparentes contra o fundo escuro corado por *Coomassie blue*, correspondente a gelatina não digerida nos géis. Após serem escaneados os géis foram submetidos à análise densitométrica pelo programa *TotalLab TL120 1D v 2009* (*Nonlinear Dynamics Ltd*).

Os sobrenadantes coletados das culturas de células foram ainda submetidos à dosagem de proteínas com *Kit* de ácido bicinonínico (BCA), sendo realizada a correção da análise densitométrica pelos valores proteicos de cada amostra.

#### b) Para a linhagem de células endoteliais de aorta de coelho - RAEC

Para avaliação das atividades de MMP-2 e MMP-9, células endoteliais de aorta de coelho foram cultivadas em placa de P35 na concentração de  $3,5 \times 10^4$  células em meio F12/SFB. Após cultivo de 72 horas, o meio de cultura foi substituído e as células foram tratadas com os polissacarídeos sulfatados (100 µg/µL) por 24 horas de incubação 37°C, 5% O<sub>2</sub>, o sobrenadante da cultura de células foi coletado e armazenada a -80°C para análises posteriores.

A análise das atividades de MMP-2 e MMP-9 foi determinada por zimografia de forma semelhante a realizada para a linhagem RAW 264.7, descrita anteriormente.

## 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados usando o programa *GraphPad Prism* versão 6.0, e cada ponto representa a média ± desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando teste ANOVA de análise de variância e, em sequência pelo teste de *Tukey's*. Valores de  $p < 0.05^*$ ,  $< 0.01^{**}$ ,  $< 0.001^{***}$ ,  $< 0,0001^{****}$  foram considerados significativos.

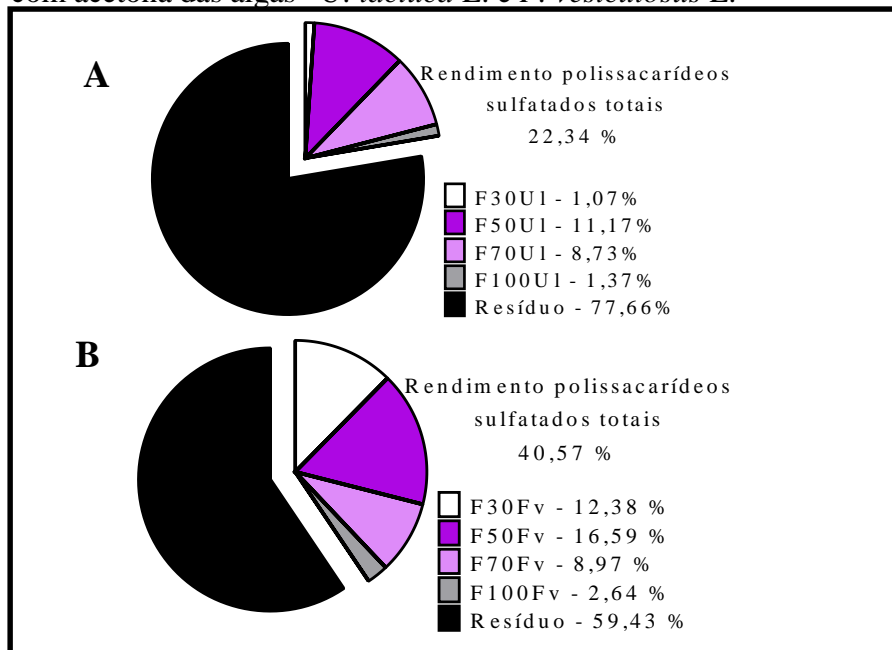
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DAS FRAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DAS ALGAS *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.

#### 5.1.1 Extração e rendimento das frações cetônicas obtidas das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.

Para o processo de extração, partiu-se de 35 g da alga *U. lactuca* L. e de 50 g da alga *F. vesiculosus* L. Após despigmentação, o peso seco de partida das algas foi de 34,490 g da alga *U. lactuca* L. e 49,830 g *F. vesiculosus* L. A partir do fracionamento com volumes crescentes de acetona PA obtivemos quatro frações polissacarídicas denominadas F30U1, F50U1, F70U1 e F100U1 para a alga *U. lactuca* L. e quatro frações F30Fv, F50Fv, F70Fv e F100Fv para a alga *F. vesiculosus* L. Todas as frações foram secas e pesadas para posterior cálculo do percentual de rendimento com base nos pesos secos de partida informados anteriormente, conforme demonstrado nas Figuras 14A e Figura 14B.

Figura 14 – Rendimento percentual das frações obtidas por precipitação com acetona das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



A: Rendimentos percentuais das frações cetônicas de *U. lactuca* L.; B: Rendimentos percentuais das frações cetônicas de *F. vesiculosus* L. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A Figura 14A mostra que as frações de *U. lactuca* L. F50UI e F70UI apresentaram maiores percentuais de rendimento (11,17% e 8,73%, respectivamente), quando comparadas as demais frações F30UI (1,07%) e F100UI (1,37%). Enquanto a análise da Figura 14B, correspondente as frações de *F. vesiculosus* L., permite observar maiores percentuais de rendimento para as frações F30Fv, F50Fv, F70Fv (12,38%, 16,59 e 8,97%, respectivamente), em relação a fração F100Fv (2,64%).

De acordo com Costa e colaboradores (2012a), a adição de volumes crescentes de acetona gradativamente reduz a constante dielétrica da água, promovendo, assim, a precipitação de diferentes porções de polissacarídeos. A separação dos polissacarídeos pela acetona é dependente da interação das cargas dessas macromoléculas com a água, sendo que aquelas que sofrem maior interação são as últimas a precipitar.

Em trabalhos anteriores com diferentes algas, nos quais foi também utilizada a precipitação com acetona, foram observados rendimentos mais elevados para as frações precipitadas com 50 % do volume de acetona, de forma semelhante ao que ocorreu no presente trabalho (ROCHA *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2012a). No entanto, outros estudos também apontam maiores rendimentos para as frações precipitadas com volumes diferentes de acetona, como o trabalho de Castro e colaboradores (2015) com a alga *Lobophora variegata*, em que a fração de maior rendimento foi a precipitada com 80 % de acetona. Dessa forma, o rendimento de cada uma das frações, irá depender da espécie de alga em estudo e da constituição de polissacarídeos de cada uma delas.

Para a alga *U. lactuca* L. é interessante notar que não há relatos do emprego da extração por proteólise enzimática, seguido de fracionamento com acetona.

Os diferentes processos de extração afetam a composição química das ulvanas e em particular a composição de sulfato, de cinzas e conteúdo de açúcar totais dos extratos (YAICH *et al.*, 2014).

Em trabalhos anteriores a forma de extração empregada, na maioria das vezes, foi a que combina a extração com água quente, seguida de precipitação com etanol absoluto (SHATI AVEL *et al.*, 2008; EL BACK; EL BAZ; EL BAROTY, 2009; HASSAN *et al.*, 2011; CHIU *et al.*, 2012), sendo encontrado também relato de extração por etanol 85%, seguida de precipitação com etanol absoluto (EL BACK; EL BAZ; EL BAROTY, 2009). Os rendimentos obtidos pelos diferentes métodos já citados ficaram em torno de 20% (CHIU *et al.*, 2012), 10,32-14,52 % (EL BACK; EL BAZ; EL BAROTY, 2009), o que são valores próximos ao rendimento obtido neste trabalho (22,34%), no entanto, inferiores.

Tian e colaboradores (2015) estudaram os diferentes interferentes no processo de extração dos polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L. e também obtiveram rendimentos inferiores aos deste trabalho. Os valores obtidos por esses autores ficaram entre (9,33-17,57%), sendo que o melhor rendimento foi aquele resultante da combinação de NaOH 2%, 90°C, 5 horas de extração, razão material/água (1:80) e auxílio de ultrassonicador.

Em seu estudo Yaich e colaboradores (2013) pesquisaram as influências de diferentes condições de extração (pH 1,5 e 2), temperatura: 80°C e 90°C e tempo de extração (1 e 3 h) no rendimento em polissacarídeos dos extratos. Os autores obtiveram rendimentos em torno de 21,68-32,67% e perceberam que o aumento do pH parece ser o fator que contribui de forma mais positiva neste processo. Ainda de acordo com Yaich e colaboradores (2014), o emprego combinado da extração química e enzimática contribui para a eficiência do processo de extração, enquanto o emprego de condições drásticas de pH e temperatura (pH 1,5, 90°C) parecem interferir de forma negativa no mesmo. Da mesma forma, para Chiu e colaboradores (2012) o emprego de temperaturas inferiores parece contribuir para a extração de polissacarídeos de elevado peso molecular.

Com base nos trabalhos citados anteriormente, as condições de extração (60°C, pH 9, 24 horas, hidrólise enzimática, precipitação com acetona), empregadas no presente estudo, foram satisfatórias para a extração dos polissacarídeos de *U. lactuca* L. com um rendimento em torno de 22%.

No caso da alga parda *F. vesiculosus* L., percebe-se que em grande parte dos estudos realizados para essa espécie utiliza como material experimental o fucoïdan, um polissacarídeo rico em fucose extraído de algas pardas (MEDEIROS *et al.*, 2008; KWAK *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015).

Como *F. vesiculosus* L. não é uma alga nativa da costa litorânea brasileira, sua extração torna-se mais complicada, e talvez por esse motivo opte-se por trabalhar com o fucoïdan, adquirido comercialmente. De acordo com Zhang e colaboradores (2015), o processo de extração do fucoïdan comercial ocorre a partir da alga seca e moída, por um processo que utiliza a água fria e filtração seletiva, na ausência de solventes ou excipientes.

No presente estudo, optou-se por realizar a extração do polissacarídeo sulfatado a partir do pó da alga *F. vesiculosus* L., adquirido comercialmente. O rendimento total do processo de extração obtido foi de 40,57 %, enquanto que os rendimentos das frações cetônicas precipitadas com 30%, 50%, 70% e 100% do volume de acetona foram de 12,38%, 16,59% e 8,97%, 2,64%, respectivamente (Figura 14B).

Outros autores realizaram o fracionamento com a acetona, parecido com o realizado neste trabalho, no entanto a partir do fucoïdan adquirido comercialmente e com volumes diferentes de acetona. Para esses trabalhos os rendimentos das frações cetônicas precipitadas com 100%, 200% e 300% do volume de acetona, foram superiores aos obtidos no presente estudo e ficaram em torno de 10,7%, 36,7% e 52,3%, respectivamente (CARDOSO, 2007; AZEVEDO, 2006).

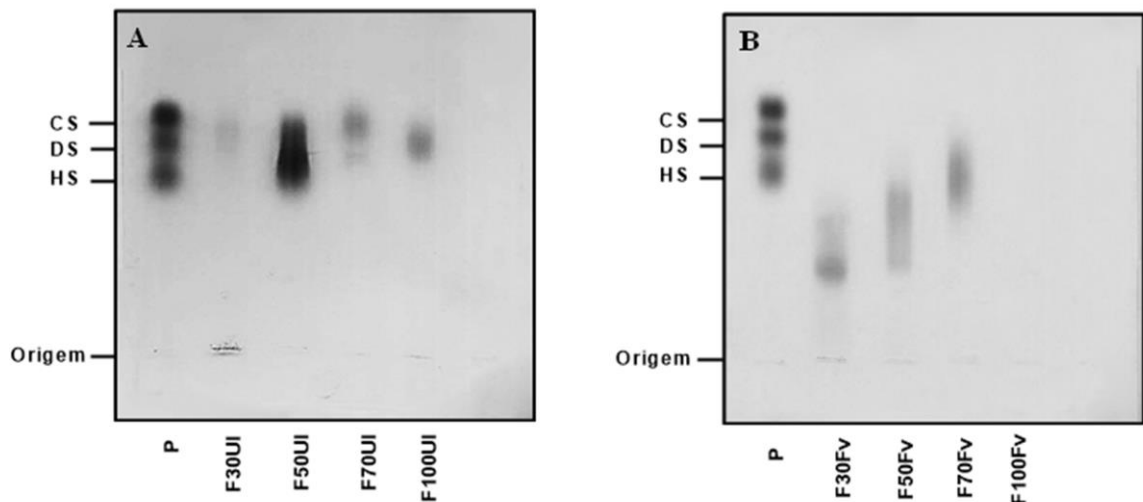
Destaca-se, no entanto, que as diferenças de rendimento mostradas anteriormente estão diretamente relacionadas as diferenças nos processos de extração empregados.

### **5.1.2 Perfil eletroforético dos polissacarídeos sulfatados das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.**

As frações polissacarídicas obtidos por precipitação com acetona para cada uma das algas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose tampão PDA 0,05M, pH 9,0. O perfil da migração eletroforética das frações (Figura 15) foi observado após uso do corante azul de toluidina, que ao se complexar com os grupamentos sulfato dos polissacarídeos sulfatados produz metacromasia identificada pela cor violácea. A análise da Figura 15 (A e B) sugere a presença de polissacarídeos sulfatados nas frações F30UI, F50UI, F70UI, F100UI e nas frações F30Fv, F50Fv e F70Fv, enquanto que para a fração F100Fv, mesmo após a aplicação de 250 µg de amostra no gel, não foi observado a coloração que indica a presença de compostos sulfatos.

É interessante notar que para observação de metacromasia foi necessário a aplicação no gel de agarose de menores quantidades de amostra para as frações F50UI (50 µg) e F70UI (50 µg), enquanto que foram necessárias maiores quantidades de massa para as frações F30UI (250 µg) e F100UI (150 µg) (Figura 15A). Já dentre as frações de *F. vesiculosus* L. (Figura 15B) foram necessários a aplicação de menores quantidades de amostra para as frações F50Fv (25 µg) e F70Fv (25 µg), enquanto que para a fração F30Fv foi necessário a aplicação de 100 µg.

Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose das frações cetônicas das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L



Alíquotas das frações cetônicas de *U. lactuca* L. - F30UI (250 µg), F50UI (50 µg), F70UI (50 µg), F100UI (150 µg) - e das frações de *F. vesiculosus* L. - F30Fv (100 µg), F50Fv (25 µg), F70Fv (25 µg), F100Fv (250 µg) - e dos padrões (5 µg de cada padrão) foram aplicados em gel de agarose, tampão PDA 0,05 M, pH 9,0. Após precipitação em CETAVLON, as lâminas foram coradas com azul de toluidina. P = padrões de condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparim sulfato (HS); A) Eletroforese *U. lactuca* L.; B) Eletroforese *F. vesiculosus* L. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

De acordo com o método desenvolvido por Dietrich e Dietrich (1976), a separação de diferentes polissacarídeos sulfatados, baseia-se na interação entre as cargas positivas da diamina presente no tampão e as cargas negativas desses compostos, desta forma moléculas que apresentam maior densidade de cargas interagem mais com a diamina e migram menos no gel, enquanto as moléculas de menor densidade de cargas, migram mais em relação a origem do gel. Vale destacar, que essa interação é dependente também do espaçamento entre cargas vicinais, ou distribuição dessas cargas na molécula.

Pela análise do perfil eletroforético observa-se a presença de bandas de cor violácea nas frações das algas com distintos graus de migração. Nota-se que das frações de *U. lactuca* L. (Figura 15A), a menor mobilidade foi da fração F50UI, enquanto que para *F. vesiculosus* L. (Figura 15B), as frações F30Fv e F50Fv apresentaram esse comportamento.

A partir do rendimento em massa obtido (Figura 14) e do perfil eletroforético de cada uma das frações das algas (Figura 15), optou-se por dar prosseguimento aos estudos com as frações que apresentaram maior rendimento associado ao melhor perfil eletroforético, ou seja, com as frações para as quais a revelação de metacromasia, referente a presença grupos sulfato, foi mais intensa e obtida com menor massa de amostra. Dessa forma, as etapas subsequentes

do trabalho foram realizadas com as frações: F50UI, F70UI de *U. lactuca* L. e F50Fv, F70Fv de *F. vesiculosus* L..

### **5.1.3 Análise da composição química e massa molecular das frações polissacarídicas das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.: F50UI, F70UI, F50Fv e F70Fv**

Os resultados das análises químicas das frações polissacarídicas encontram-se apresentados na Tabela 1. Os dados obtidos demonstraram que para a fração de polissacarídeos F50UI de *U. lactuca* L. o conteúdo de açúcares totais (68,02%) foi superior ao da fração F70UI (29,14%).

Trabalhos anteriores com polissacarídeos de *U. lactuca* L., obtidos por processos de extração distintos do utilizado neste trabalho, encontraram tanto valores superiores de açúcares totais 65,4% (SHATIABEL *et al.*, 2008), 79% (DEVAKKI *et al.*, 2009), quanto valores inferiores 21-36% (CHIU *et al.*, 2012), 37-51% (EL BACK; EL BAZ; EL BAROTY, 2009).

Em relação aos ácidos urônicos percebe-se que a fração F50UI (32,14%) apresentou conteúdo próximos aqueles já encontrados na literatura 17,2% (SHATIABEL *et al.*, 2008), 30% (DEVAKKI *et al.*, 2009), 20,37-23,60% (YAICH *et al.*, 2013), enquanto a fração F70UI (4,32%) apresentou teores inferiores.

Pela análise quantitativa do teor de sulfato percebe-se que F50UI apresentou 19,97% de sulfato, enquanto F70UI apresenta um teor maior (52,81%). Nota-se, no entanto, que embora o conteúdo de sulfato seja maior na fração F70UI, o conteúdo de ácidos urônicos é cerca de sete vezes maior na fração F50UI, o que pode justificar o grau de migração inferior observado por essa fração na corrida eletroforética (Figura 15A). Quanto a coloração observada no gel de eletroforese, percebe-se que para a fração F70UI, com maior conteúdo de sulfato, o efeito de metacromasia foi menos intenso que para a fração F50UI, o que pode estar relacionado com a distribuição e disposição dos grupamentos sulfatados nas estruturas desses polissacarídeos, interferindo diretamente na reação entre esses elementos e o corante azul de toluidina.

Vale destacar, que os conteúdos de sulfato dos polissacarídeos das frações cetônicas de *U. lactuca* L., obtidos neste trabalho, são superiores aos relatados em estudos anteriores que utilizaram a extração com água quente seguida de metanol, a saber: 11-14% (CHIU *et al.*, 2012), 17,4% (SHATIABEL *et al.*, 2008), 8,52-12,45 % (EL BACK; EL BAZ; EL BAROTY,



2009) e aqueles que utilizaram a proteólise enzimática associada aos passos anteriores de extração 26-32% (COSTA *et al.*, 2012).

Os pesos moleculares estimados por eletroforese em gel de poliacrilamida foram da ordem de 185,28 KDa e 163,44 KDa, para as frações F50UI e F70UI, respectivamente. Yaich e colaboradores (2014), ao pesquisar diferentes condições de extração de polissacarídeos de algas do gênero *Ulva*, perceberam que a combinação de condições enzimáticas (proteólise, 2 hs, 50°C, pH 7) e químicas (procedimento de *desalting* e precipitação com quatro volumes de etanol 96%) contribuem para a extração de polissacarídeos de elevado peso molecular, enquanto condições drásticas de pH e temperatura (pH 1,5 e 90°C) contribuem para a extração de polissacarídeos de baixo peso molecular.

Chiu e colaboradores (2012), usando extração em água quente e precipitação com etanol, obtiveram polissacarídeos de *U. lactuca* L. de pesos moleculares próximos aos obtidos no presente trabalho, sendo da ordem de 160, 220 e 253KDa, ao utilizar diferentes condições de temperatura (121, 100 e 50°C, respectivamente), durante uma hora. Os autores conseguiram perceber a influência da temperatura no peso molecular desses polissacarídeos, sendo que quanto menor a temperatura empregada, maior o peso molecular dessas moléculas. A análise dos trabalhos anteriores e das condições de extração empregadas neste estudo (pH ~ 9,0; 60 °C; extração química e enzimática) podem justificar os elevados pesos moleculares obtidos, isso porque as condições de temperatura e pH empregadas foram menos drásticas, o que pode evitar a quebra dos polissacarídeos e, conseqüentemente, a redução do seu peso molecular.

Tabela 1 – Composição química das frações de *Fucus vesiculosus* L. e *Ulva lactuca* L.

Polissacarídeos sulfatados	Açúcares totais (%)	Ácidos urônicos (%)	Sulfatos (%)	Razão S/AT	Proteínas (%)	Peso molecular (kDa)
F50Fv	95,89±0,01	28,30±0,01	10,36±0,00	0,11	*n.d.	358,50
F70Fv	96,39±0,02	36,31±0,01	15,33±0,00	0,16	*n.d.	272,20
F50UI	68,02±0,04	32,71±0,05	19,97±0,00	0,29	*n.d.	185,28
F70UI	29,14±0,05	4,32±0,00	52,81±0,01	1,81	*n.d.	163,44

S/AT: razão entre o conteúdo de sulfato e o conteúdo de açúcares totais \*n.d.: não detectado;  
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Para as frações de *F. vesiculosus* L. foi observado um alto conteúdo de açúcares totais para F50Fv (95,89 %) e F70Fv (96,39%), valores superiores aos obtidos por Cardoso (2007) em seu trabalho (41,5-55,3%). Quanto a presença de ácidos urônicos (28,30 % para F50Fv e 36,31 % para F70Fv), pode-se notar um conteúdo muito próximo entre as frações obtidas.

A dosagem de sulfato revelou (10,36 % para F50Fv e 15,53 % para F70Fv), valores esses inferiores aos da literatura 26-55% (CARDOSO, 2007) e 44,1 % (AZEVEDO, 2006).

Os pesos moleculares estimados para as frações de *F. vesiculosus* L. foram da ordem de 358,50 e 272,20 KDa para as frações F50Fv e F70Fv, respectivamente. Valores superiores aos das frações cetônicas (170, 117 e 15,2KDa) obtidas por Azevedo (2006) a partir de um fucoidan (179KDa).

Tanto para as frações F50UI e F70 UI de *U. lactuca* L., quanto para as frações de *F. vesiculosus* L. não foram detectadas a presença de proteínas. Enquanto que em outros trabalhos com *F. vesiculosus* L. foram encontrados traços de proteínas (0,5-0,7%) (CARDOSO, 2007), 0,8% (AZEVEDO, 2006). Da mesma forma que em trabalhos anteriores com *U. lactuca* L. foram encontrados 1-2% de proteínas, após extração com água quente, associada a hidrólise enzimática e precipitação com etanol (COSTA *et al.*, 2012). A partir desses resultados percebe-se que a combinação das condições de extração e fracionamento utilizadas neste trabalho foram satisfatórias, contribuindo para a ausência de proteínas nas frações, o que pode ser justificado pelo fato de que a proteólise com alcalase, é capaz de quebrar ligações entre os polissacarídeos e resíduos protéicos. Associado a isso, o fracionamento com acetona empregado, devido as características desse solvente, é capaz de alterar a constante dielétrica da solução de extração, resultando na precipitação seletiva dos polissacarídeos conforme o volume de acetona usado.

A análise da razão (S/AT) encontra-se também apresentada na Tabela 1. Para essa análise que leva em consideração tanto o conteúdo de sulfato quanto o conteúdo de açúcares totais, percebe-se que a F70UI apresentou a maior razão entre todas as amostras, sendo de (1,81), enquanto F50UI (0,29), F50Fv (0,11) e F70Fv (0,16).

De acordo com Yaich e colaboradores (2014) variações nas condições de extração, podem resultar em variações em termos de rendimento, composição química e de características moleculares. Dessa forma, ressalta-se que as diferenças encontradas entre os valores de rendimento, e a composição químicas dos extratos obtidos no presente estudo e os valores da literatura devem-se sobretudo as diferentes condições de extração.

#### **5.1.4 Composição monossacarídica das frações F50UI, F70UI, F50Fv e F70Fv obtidas das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.**

A composição monossacarídica dos polissacarídeos sulfatados obtidos para as algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L. foi avaliada por eletroforese - *Fluorophore Assisted Carbohydrate Eletrophoresis* (FACE) - e por cromatografia descendente em papel.

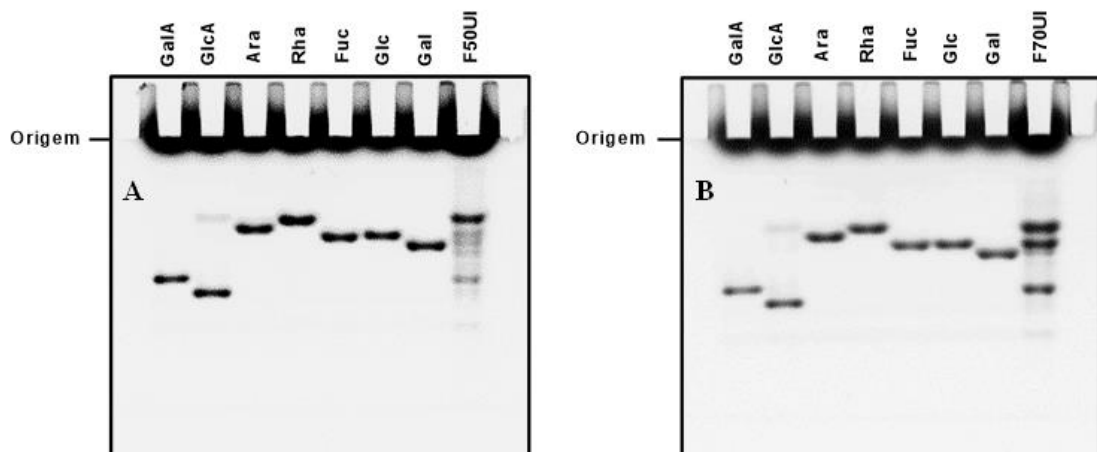
a) *Fluorophore Assisted Carbohydrate Eletrophoresis* (FACE)

Inicialmente, foi realizada uma comparação entre os perfis da corrida eletroforética de padrões de monossacarídeos e das frações das algas submetidas a hidrólise.

A partir dessa comparação pode-se perceber que a fração F50UI de *U. lactuca* L. (Figura 16A) após hidrólise, apresentou bandas de migração correspondentes os padrões de ramnose, glicose, galactose e ácido galacturônico. Além disso, foi observada a presença de uma banda de menor intensidade referente ao ácido glicurônico e outra com migração abaixo do padrão monossacarídico de galactose que não obteve correspondência com nenhum dos padrões utilizados.

Para a fração F70UI de *U. lactuca* L., (Figura 16B) foram observadas bandas de migração correspondente ao perfil de corrida dos padrões de ramnose, glicose, galactose e ácido galacturônico e com menor intensidade ácido glicurônico.

Figura 16 – Eletrofluorogramas dos produtos de hidrólise das frações de *U. lactuca* L



Alíquotas de cerca de 100 µg das amostras F50UI, F70UI foram submetidas a hidrólise (HCL 6M, 6 horas, 100 C) e o correspondente a 80 µg de F50UI, 40 µg de F70UI foram incubados com AMAC (50mmol) por 16 horas para derivatização, enquanto 2 µg de cada um dos padrões foram incubados com AMAC (20mmol). As amostras derivatizadas foram submetidas a FACE no sistema Tris-borato, pH 8,3. A: FACE fração F50UI; B: FACE fração F70UI; GalA: ácido galacturônico; Glc: ácido glicurônico; Ara: arabinose; Rha: ramnose; Fuc: fucose; Glc: glicose; Gal: galactose; F50UI: fração F50 de *U. lactuca* L.; F70UI: fração F70 de *U. lactuca* L.. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os eletrofluorogramas assim obtidos foram analisados pelo programa *TotalLab* TL120 1D v 2009 (*Nonlinear Dynamics* Ltd) e as proporções entre esses monossacarídeos a partir da densitometria foram estabelecidas para cada uma das frações de *U. lactuca* L., conforme Tabela 2. Por essa análise percebe-se que para F50UI a proporção entre ramnose, ácido urônico,

glicose, galactose foi de (1:0,333:0,081:0,052). Para a fração F70UI, por sua vez, a proporção entre ramnose, ácido urônico, glicose, galactose foi de (1:0,666:0,835:0,009).

Tabela 2 - Composição monossacarídica das frações de *Ulva lactuca* L.

<b>Polissacarídeos sulfatados</b>	<b>Ramnose</b>	<b>Ácido urônico</b>	<b>Glicose</b>	<b>Galactose</b>	<b>Traços</b>
F50UI	1	0,333	0,081	0,052	0,042
F70UI	1	0,666	0,835	0,009	-

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

As frações polissacarídicas de *U. lactuca* L. apresentam como constituinte monossacarídico majoritário a ramnose.

Os resultados referentes a composição monossacarídica de polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L., analisadas em trabalhos anteriores e apresentados a seguir, corroboram com os resultados apresentados neste trabalho.

Polissacarídeos de *U. lactuca* L. obtidos por extração em água quente e proteólise enzimática, seguida de precipitação com etanol, continham como monossacarídeo majoritário a ramnose (22,4%), seguida de ácido glicurônico (22,5%), além de apresentarem baixas proporções de xilose (3,7%), ácido idurônico (3,1%) e glicose (1,0%) (COSTA *et al.*, 2012).

Yaich e colaboradores (2013), trabalhando com extratos de *U. lactuca* L., obtidos por diferentes condições de extração com água quente, seguida de precipitação com etanol com variação das condições de pH, temperatura e tempo de extração, perceberam que todos os extratos continham ramnose (13,35-15,59%), glicose (2,90-10,79%) e xilose (2,36-2,73%).

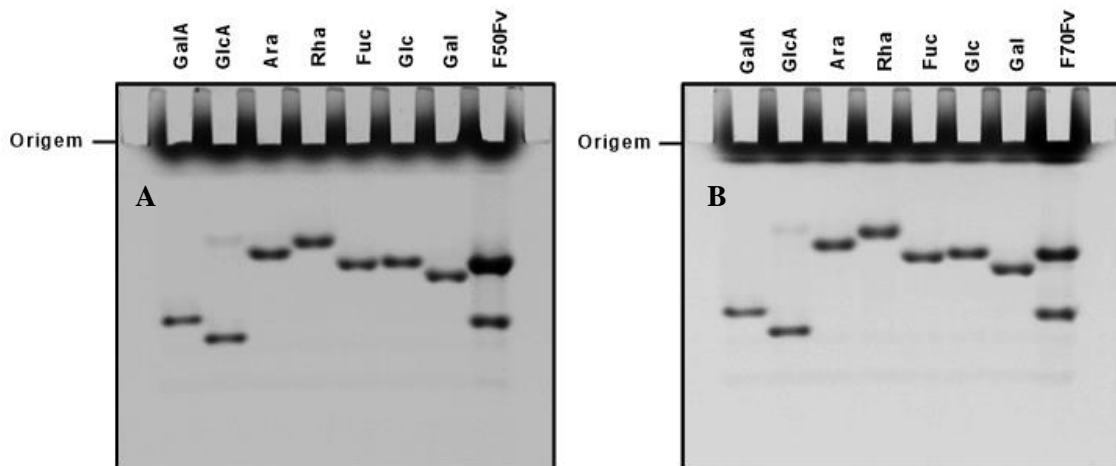
Tian e colaboradores (2015), ao analisar dois extratos de polissacarídeos de *U. lactuca* L. extraídos com água quente e auxílio de ultrassonicador, seguida de precipitação com etanol, observaram a presença dos monossacarídeos ramnose, xilose, glicose e ácido glicurônico, sendo que, a ramnose também foi o monossacarídeo majoritário (51,2; 60,8%), seguida por ácido urônico (16,4; 16,8%) e por glicose (8,2; 20,1%).

A análise da composição monossacarídica das frações obtidas por fracionamento em acetona da alga *F. vesiculosus* L. também foi realizada por comparação entre os perfis da corrida eletroforética de padrões de monossacarídeos e as frações da alga submetidas a hidrólise. Nas Figuras 17A e 17B percebe-se que as frações F50Fv e F70Fv apresentaram bandas de migração correspondentes aos padrões de fucose e ácido galacturônico.

As proporções entre esses monossacarídeos foram estabelecidas para cada uma das frações de *F. vesiculosus* L. e estão apresentadas na Tabela 3. Essa análise demonstrou que ambas as frações apresentaram elevado conteúdo de fucose, sendo que para F50Fv a proporção

entre fucose e ácido galacturônico foi de (1:0,286), enquanto para F70Fv de (1:0,511), confirmando a dosagem química já apresentada na Tabela 1, na qual a fração F70Fv de *F. vesiculosus* L. possui maior conteúdo de ácidos urônicos que a fração F50Fv. A mesma relação não foi estabelecida pela análise densitométrica das frações de *U. lactuca* L., que diferentemente da dosagem química (Tabela 1), mostrou maior conteúdo de ácido urônicos na fração F70U1 (0,666), enquanto para a fração F50U1 (0,333).

Figura 17 – Eletrofluorogramas dos produtos de hidrólise das frações de *F. vesiculosus* L.



Alíquotas de cerca de 100 µg das amostras F50Fv, F70Fv foram submetidas a hidrólise (HCl 6M, 6 horas, 100 C) e o correspondente a 80 µg de F50Fv, 40 µg de F70Fv e a 2 µg de cada um dos padrões foram incubados com AMAC (50mmol) por 16 horas para derivatização. As amostras derivatizadas foram submetidas a FACE no sistema Tris-borato, pH 8,3. A: FACE fração F50U1; B: FACE fração F70U1; GalA: ácido galacturônico; Glc: ácido glicurônico; Ara: arabinose; Rha: ramnose; Fuc: fucose; Glc: glicose; Gal: galactose; F50Fv: fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Da mesma forma que os polissacarídeos analisados no presente estudo, no trabalho de Rodriguez-Jasso e colaboradores (2014), polissacarídeos de *F. vesiculosus* L. obtidos por dois diferentes processos de extração, envolvendo a utilização de micro-ondas e de auto hidrólise apresentaram como principal monossacarídeo a fucose (53,8 % e 76,8%, respectivamente). Para os polissacarídeos extraídos com auxílio de micro-ondas ainda foram obtidos 35,3% de xilose e 10,8% de galactose, enquanto que para os extraídos por auto hidrólise 23,2 % de galactose e ausência de xilose.

Ainda com relação a constituição química dos polissacarídeos de *F. vesiculosus* L., segundo Li e colaboradores (2008), os polissacarídeos dessa espécie de alga possuem em geral uma composição química simples, sendo formados principalmente por fucose e sulfato, no

entanto existem também compostos mais complexos que além de fucose e sulfato, contém monossacarídeos como manose, galactose, glicose, xilose, ácidos urônicos, entre outros.

Tabela 3 – Composição monossacarídica das frações de *Fucus vesiculosus* L.

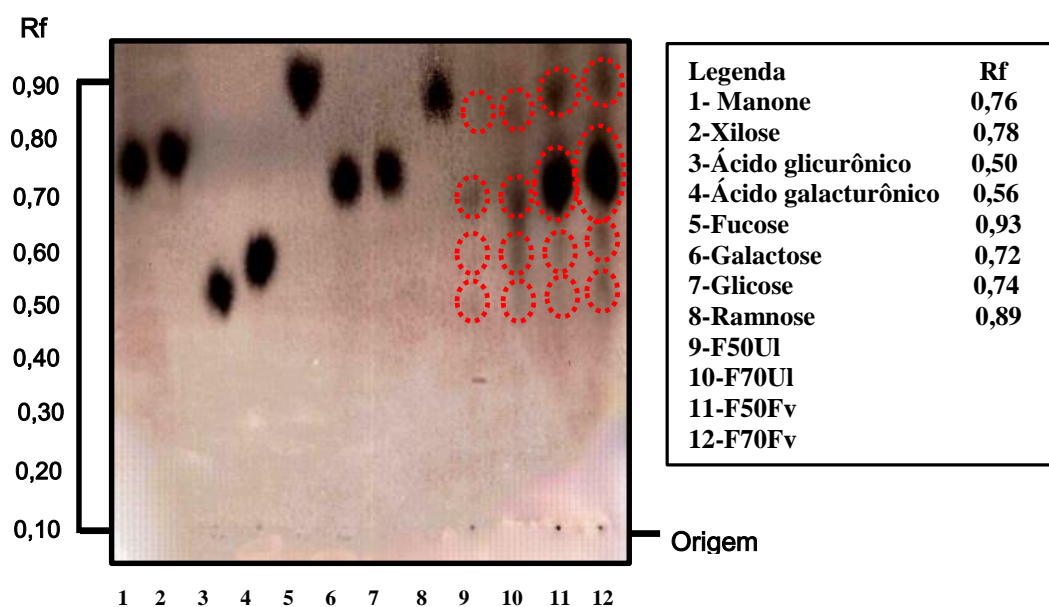
Polissacarídeos sulfatados	Fucose	Ácido urônico
F50Fv	1	0,286
F70Fv	1	0,511

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

#### b) Cromatografia descendente em papel

A análise por cromatografia em papel da composição monossacarídica das frações polissacarídeos F50UI e F70UI (Figura 18) permite confirmar a presença de ramnose (Rf 0,88; 0,85), galactose (Rf 0,681, 0,681), ácido galacturônico (Rf 0,55; 0,55) e ácido glicurônico (Rf 0,45; 0,45). Enquanto que para as frações F50Fv e F70Fv, além dos monossacarídeos fucose (Rf 0,90; 0,92), ácido galacturônico (Rf 0,60; 0,60) e ácido glicurônico (Rf 0,46; 0,50), pode-se observar bandas referentes a presença de glicose (Rf 0,73; 0,73).

Figura 18 – Cromatografia em papel dos produtos de hidrólise das frações de *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



Cerca de 500 µg das amostras F50UI, F70UI, F50Fv e F70Fv foram submetidas a hidrólise (HCl 6M, 6 horas, 100 C) e alíquotas correspondentes a F50UI (250 µg), F70UI (250 µg), F50Fv (100 µg), F70Fv (100 µg) e a 10 µg de cada um dos padrões foram aplicados em papel de Whatman nº1. As amostras foram submetidas a corrida descendente em sistema ácido butírico: NH<sub>4</sub>OH 1,25 N (5:3) e reveladas com hidróxido de sódio 10M e etanol (1:20) e nitrato de prata e acetona (1:200). 1: manose; 2: xilose; 3: ácido glicurônico; 4: ácido galacturônico; 5: fucose; 6: galactose; 7: glicose; 8: ramnose; 9: F50UI -fração F50 de *U. lactuca* L.; 10: F70UI - fração F70 de *U. lactuca* L.; 11: F50Fv - fração F50 de *F. vesiculosus* L.; 12: F70Fv - fração F70 de *F. vesiculosus* L. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Conforme observado, a análise da cromatografia em papel foi importante pois evidenciou a presença de glicose nas frações de *F. vesiculosus* L., sugerindo que as intensas bandas observadas na FACE para essas frações e atribuídas a fucose, estão relacionadas a presença de fucose e também de glicose. Além disso, pela análise cromatográfica percebe-se a presença de bandas referentes a presença de ácido glicurônico (Rf 0,45-0,50) em todas as frações, que na FACE foram observadas como bandas de baixa intensidade.

### **5.1.5 Análises espectroscópicas das frações F50U1, F70U1, F50Fv e F70Fv obtidas das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.**

As técnicas espectroscópicas Raman e Infravermelho estão correlacionadas a energia vibracional, permitindo detalhar propriedades e características estruturais moleculares e fornecendo uma completa impressão digital molecular da amostra em estudo. Ambas são técnicas rápidas, não destrutivas e onde há necessidade de pequena quantidade de amostra para a análise. Convencionalmente nessas técnicas há necessidade de procedimentos laboriosos para se obter uma boa relação sinal/ ruído e no caso da espectroscopia Raman a utilização de espectrômetros dispersivos que incidem sobre a amostra um laser visível, muitas vezes resulta em forte sinal de fundo de fluorescência, o que é indesejado. A utilização do Transformador de Fourier, no entanto, reduziu essas limitações, bem como os tempos de análise, além disso, a utilização de laser operando a 1064 nm na espectroscopia Raman (distante da região do visível) em espectrômetro interferométrico, foi generalizado para diminuir o nível de fluorescência e evitar a degradação da amostra (PEREIRA *et al.*, 2003).

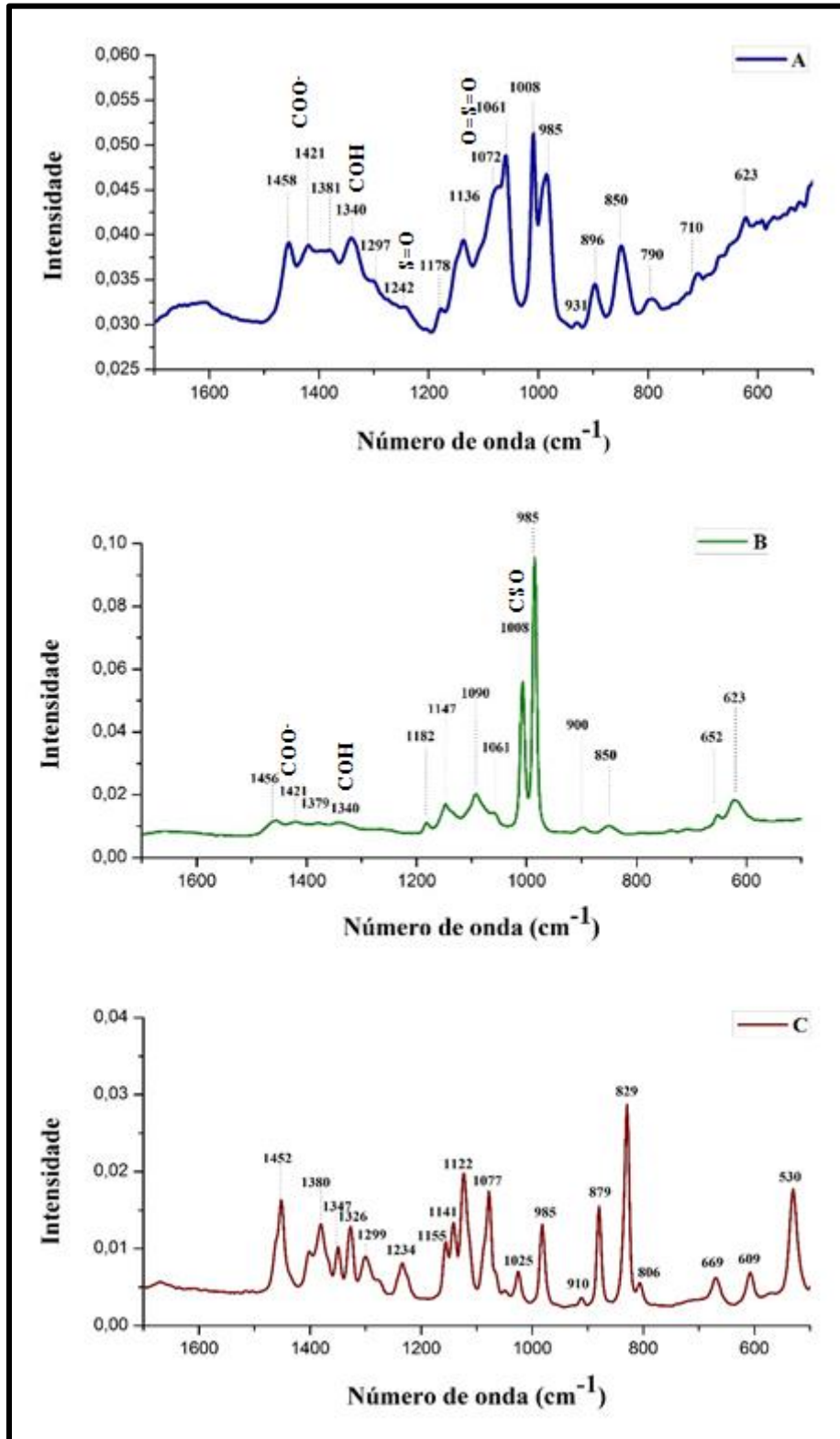
A análise dos espectros de Raman das frações polissacarídicas de *U. lactuca* L. e de *F. vesiculosus* L. foi realizada pela comparação entre as principais bandas apresentadas nos espectros obtidos e dados da literatura (Tabela 4).

Para os polissacarídeos de *U. lactuca* L. não foram encontradas análises pela técnica de espectroscopia Raman e por isso, para análise das principais bandas obtidas para as frações polissacarídicas desta alga, foram utilizados dados referentes a estudos com polissacarídeos de algas e organismos marinhos de uma forma geral.

De acordo com Matsuhira, Román e Torres (2012), a banda em 1419  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a vibração por estiramento do grupo  $\text{COO}^-$ , enquanto que para Pielesz, Binias e Paluch (2011), assim como para outros autores, esta banda aparece em 1413  $\text{cm}^{-1}$ , podendo sofrer pequenos deslocamentos. Dessa forma, a banda em 1421  $\text{cm}^{-1}$  detectada tanto na fração F50U1 (Figura

19A), quanto na fração F70UI (Figura 19B), pode ser atribuída ao grupo  $\text{COO}^-$ , presente em monossacarídeos ácidos, como os ácidos urônicos constituintes dos polissacarídeos em estudo.

Figura 19 – Espectros Raman das frações polissacarídicas de *U. lactuca* L.



A: espectro Raman da fração F50 de *U. lactuca* L.; B: espectro Raman da fração F70 de *U. lactuca* L.; C: espectro do padrão de ramnose; Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR



Kacurakova e Mathlouthi (1996) atribuíram a banda em 1380  $\text{cm}^{-1}$  a vibração do grupamento  $\text{CH}_2$ , enquanto que para Matsuihiro, Román e Torres (2012) a banda em 1377  $\text{cm}^{-1}$  relaciona-se a deformação C-H de grupos metila. Pela análise dos espectros de Raman, percebe-se uma banda em 1383  $\text{cm}^{-1}$  para F50UI e uma banda em 1379  $\text{cm}^{-1}$  para F70UI, que podem estar relacionadas a grupamentos metila da estrutura desses carboidratos.

Tabela 4 - Atribuições das bandas espectroscopia de Raman

Nº de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuições
850	- 845,8: vibração de estiramento C–C, deformação O–H, vibração C–O–S (axial) (MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012); - 847: vibração C-O-S (axial) (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011); - 845-850: C-O-SO <sub>4</sub> em C <sub>4</sub> da galactose (PEREIRA <i>et al.</i> , 2003; PEREIRA <i>et al.</i> , 2009)
896	- 897: vibração C-H de beta-resíduos (VASKO; BLACKWELL; KOENIG, 1972); - 890: C-H do carbono anomérico de resíduos de $\beta$ -galactose (PEREIRA <i>et al.</i> , 2003); - 890: presença de ligações beta entre monossacarídeos (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011)
900	- 899: banda característica de $\beta$ -polissacarídeos (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011) - 899: banda característica de $\beta$ -polissacarídeos (NA <i>et al.</i> , 2010; PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011) - 890-900: $\beta$ -D-galactose não sulfatada (PEREIRA <i>et al.</i> , 2009)
931	- 929: resíduos de anidrogactose (YANG <i>et al.</i> , 2003); - 930: resíduo de 3,6-anidro-D-galactose (PEREIRA <i>et al.</i> , 2003; PEREIRA <i>et al.</i> , 2009)
985	- banda presente no padrão de Ramnose**
1008	- 1003: vibração $\text{CH}_2$ (CAEL; KOENIG; BLACKWELL, 1973); - 1006: vibração de estiramento simétrico C–O–C, vibração de estiramento C–O–S (equatorial) (MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012)
1061	- 1060: deformação C-OH (KACURAKOVA; MATHLOUTHI, 1996) - 1060: vibração de estiramento C–O e vibracional de estiramento simétrico S=O (MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012)
1072	- 1071: deformação C-H e C-O-H (VASKO; BLACKWELL; KOENIG, 1972); - 1076: vibração C-O-H (CAEL; KOENIG; BLACKWELL, 1973); - 1079: estiramentos C-O, C-C e deformações C-C-O e C-O-H (PEREIRA <i>et al.</i> , 2003) - 1072: vibração de estiramento simétrico O=S=O (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011)
1136	- 1130: deformação CH, COH (VASKO; BLACKWELL; KOENIG, 1972);
1147	- 1148: vibração C-O (KACURAKOVA; MATHLOUTHI, 1996)
1178/1182	- 1180: vibração de estiramento simétrico S=O=S (NA <i>et al.</i> , 2010; PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011)
1253/ 1242	- 1240 – 1260: vibração de estiramento S=O (PEREIRA <i>et al.</i> , 2009) - 1258: vibração de estiramento assimétrico S=O (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011)
1297	- 1298: COH, CCH, $\text{CH}_2$ (VASKO; BLACKWELL; KOENIG, 1972);
1340	- 1346: vibração C-O-H (VASKO; BLACKWELL; KOENIG, 1972); - 1337: vibrações HCC, HCO, COH (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011) - 1380: vibração $\text{CH}_2$ (KACURAKOVA; MATHLOUTHI, 1996)
1379/1380/1383	- 1380: deformação de grupos metila (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011) - 1377: deformação C-H de grupos metila (MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012)
1421	- 1419: vibração de estiramento COO <sup>-</sup> (MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012) - 1413: vibração simétrica COO <sup>-</sup> (NA <i>et al.</i> , 2010; PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011)
1456 / 1458	- 1462: deformação $\text{CH}_2$ (VASKO; BLACKWELL; KOENIG, 1972);

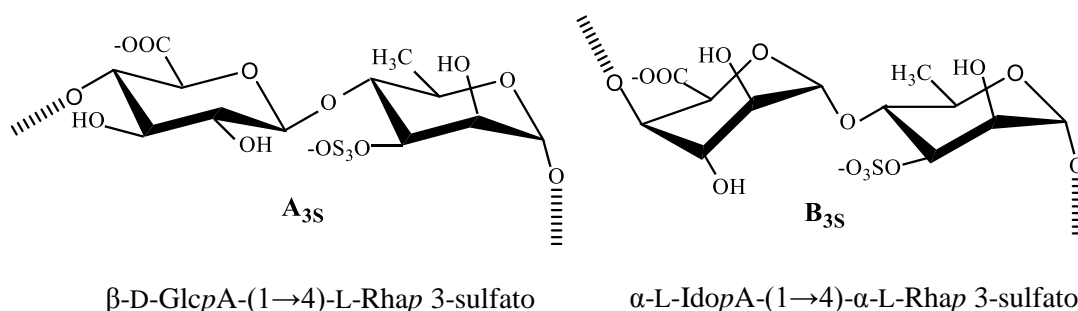
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A banda detectada em  $1061\text{ cm}^{-1}$  em ambas as frações de *U. lactuca* L. pode ser atribuída a deformação C-OH, grupamento comum em estruturas de carboidratos (KACURAKOVA; MATHLOUTHI, 1996).

Segundo Matsuhiro, Román e Torres (2012), a banda na região de  $1006\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a vibração por estiramento simétrico de C–O–C, mas também vibração por estiramento de C–O–S em posição equatorial.

A estrutura proposta do ácido aldobiurônico (Figura 20), principal unidade de repetição das ulvanas, é formada ou por uma molécula de ácido urônico unida por ligação  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) a uma molécula de ramnose 3-sulfatada (Tipo A), ou por uma molécula de ácido idurônico unida por ligação  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) a uma molécula de ramnose 3-sulfatada (Tipo B) (COSTA *et al.*, 2012). Considerando o exposto anteriormente pelos autores, a intensa banda detectada em  $1008\text{ cm}^{-1}$  nas frações de *U. lactuca* L. pode ser atribuída a vibração por estiramento da ligação C-O-S na molécula de ramnose, localizada em posição equatorial associada a vibração por estiramento de C–O–C, que ocorre nas ligações glicosídicas.

Figura 20 – Estrutura ácido aldobiurônico



A<sub>3S</sub>: Tipo A; B<sub>3S</sub>: Tipo B. Fonte: Adaptado (WANG, 2014; LAHAYE; ROBIC, 2007)

A banda detectada em  $1072\text{ cm}^{-1}$  para a fração F50UI (Figura 19 A) pode estar relacionada tanto a deformação C-H e C-O-H, que fica na região de  $1071\text{ cm}^{-1}$  (VASKO; BLACKWELL; KOENIG, 1972), como pode ser atribuída também a vibração por estiramento simétrico do grupo éster sulfato O=S=O (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011), que está presente no carbono 3 da molécula de ramnose, conforme estrutura do ácido aldobiurônico (Figura 20).

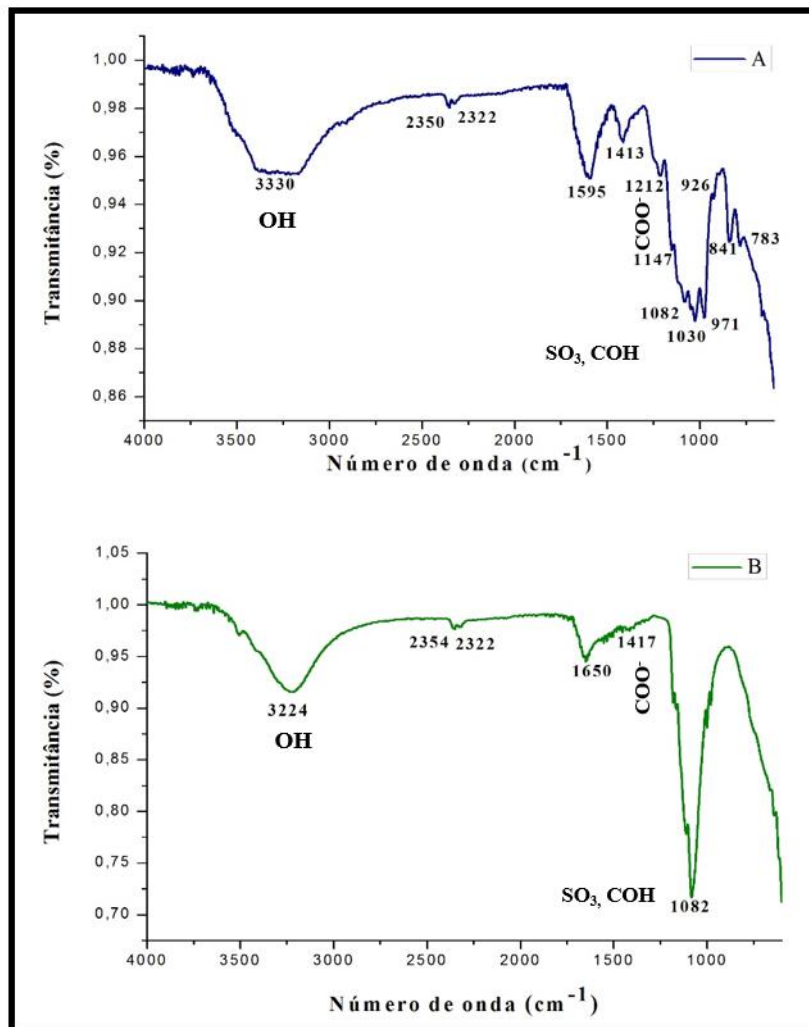
Para ambas as frações de *U. lactuca* L. observa-se também a presença de uma intensa banda em  $985\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser verificada no espectro do padrão de ramnose (Figura 19C),

referindo-se, portanto, às características estruturais deste monossacarídeo, o qual conforme as análises realizadas por FACE neste trabalho, é o monossacarídeo majoritário.

Outras bandas observadas nos espectros das frações estão relacionadas a grupamentos comuns em carboidratos a saber: 1458  $\text{cm}^{-1}$  referente a deformação de  $\text{CH}_2$  (VASKO; BLACKWELL; KOENIG, 1972); 1340  $\text{cm}^{-1}$  referente às vibrações HCC, HCO, COH (VASKO; BLACKWELL; KOENIG, 1972; PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011) e 850  $\text{cm}^{-1}$  atribuída a vibração C-O-S (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011).

A análise dos espectros de infravermelho apresentados na Figura 21 (A e B) e sua comparação com dados da literatura (Tabela 5) permitem confirmar a presença de grupamentos característicos de carboidratos já evidenciados por espectroscopia Raman para as amostras de *U. lactuca* L..

Figura 21 – Espectros de infravermelho das frações polissacarídicas de *U. lactuca* L



A: espectro Raman da fração F50 de *F. vesiculosus* L.; B: espectro Raman da fração F70 de *F. vesiculosus* L. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A banda em 3330  $\text{cm}^{-1}$  de F50UI (Figura 21A) e a banda em 3224  $\text{cm}^{-1}$  de F70UI (Figura 21B) são atribuídas a vibração por estiramento de OH (NA *et al.*, 2010; PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011; MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012).

A banda em 1413  $\text{cm}^{-1}$  de F50UI e em 1417  $\text{cm}^{-1}$  de F70UI correspondem ao movimento vibracional por estiramento do grupo  $\text{COO}^-$  (YANG *et al.*, 2003; NA *et al.*, 2010; PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011). A banda 1650  $\text{cm}^{-1}$ , evidente em F70UI, segundo Alves, Souza e Reis (2013) também deve-se ao estiramento assimétrico do grupamento  $\text{COO}^-$  de ácidos urônicos.

A intenção banda em 1082  $\text{cm}^{-1}$  em ambas as frações de *U. lactuca* L., por sua vez, de acordo Petrone e colaboradores (2011), referem-se à vibração por estiramento C-O e C-C acoplada a deformação C-O-H de polissacarídeos e, além disso, à vibração simétrica  $\text{SO}_3$ .

Tabela 5 - Atribuições das bandas de espectroscopia Infravermelho

Nº de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuições
783	- 789,8: vibração C-O-S (equatorial) (HASSAN <i>et al.</i> , 2011)
841	- 856,9: vibração de estiramento simétrico C-O-S (axial) (MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012). - 836/845: vibração C-O-S axial (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011)
926	- 925-935: ligação C-O de 3,6-anidro-D-galactose (PEREIRA <i>et al.</i> , 2003; PEREIRA <i>et al.</i> , 2009)
971	- 970-975: resíduo de galactose (PEREIRA <i>et al.</i> , 2009)
1030	- 1029,8: vibração de estiramento C-O-C, C-C (MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012)
1082	- 1082: vibração de estiramento C-O e C-C acoplada a flexão C-O-H de polissacarídeos; vibração simétrica $\text{SO}_3$ (PETRONE <i>et al.</i> , 2011) - 1149: vibração C-O-C (KACURAKOVA <i>et al.</i> , 2000)
1147/1149	- 1132: vibração de estiramento C-O, C-O-C e C-C (MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012)
1212	- 1216: deformação C-H (MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012) - 1256,9: vibração de estiramento assimétrica S=O (MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012)
1413	- 1416: vibração de estiramento simétrico $\text{COO}^-$ (NA <i>et al.</i> , 2010) - 1420: vibração de estiramento $\text{COO}^-$ (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011) - 1413: vibração de estiramento assimétrico $\text{COO}^-$ (YANG <i>et al.</i> , 2003) - 1421: vibração de estiramento simétrico $\text{COO}^-$ (YANG <i>et al.</i> , 2003)
1650	- 1642: vibração C-O (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011) - 1650: vibração de estiramento assimétrico $\text{COO}^-$ (ALVES; SOUZA; REIS, 2013) - 1650: vibração de estiramento assimétrico de $\text{COO}^-$ (MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012)
3224/ 3330	- 3482: vibração de estiramento OH (MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012) - 3410: vibração de estiramento OH (NA <i>et al.</i> , 2010) - 3384: vibração de estiramento OH (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011)

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

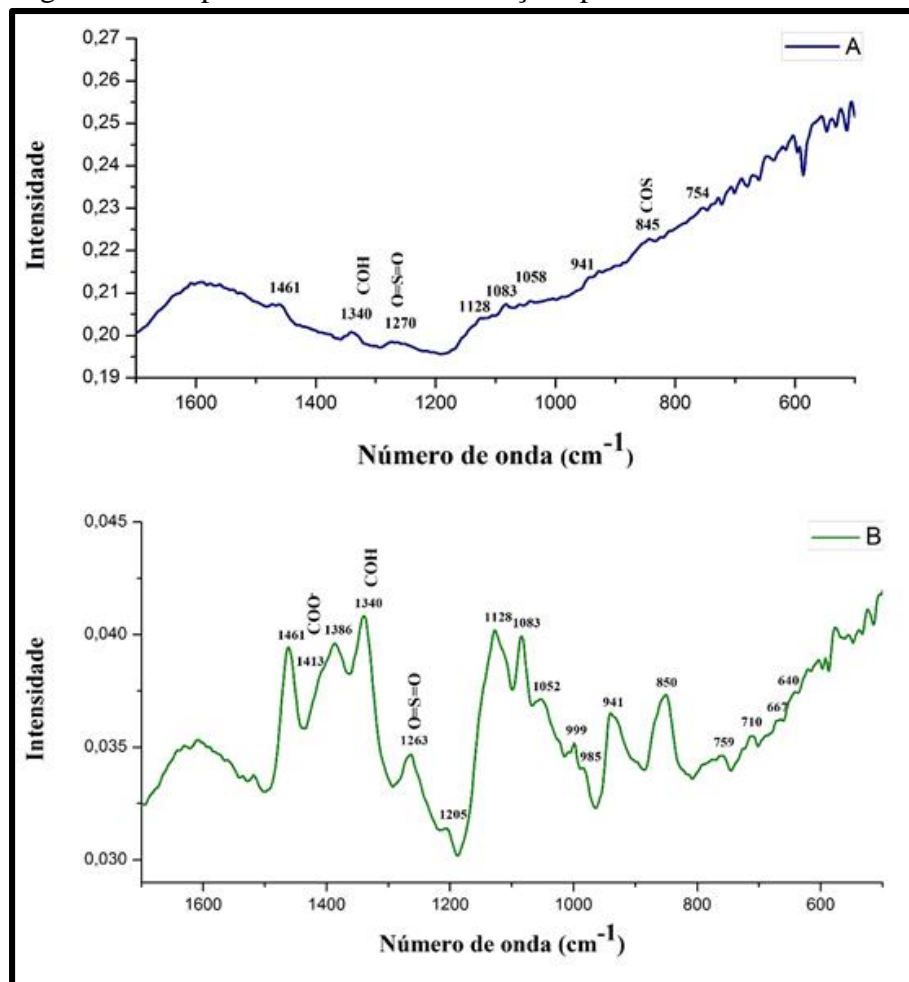
Para as frações de *F. vesiculosus* L. as técnicas espectroscópicas não foram tão eficientes quanto para *U. lactuca* L. devido a coloração escura dessas amostras, que interfere no

espalhamento de luz necessário às análises. Apesar disso, foi possível ainda realizar a detecção das principais bandas desses polissacarídeos por espectroscopia Raman.

Como pode ser observado na Figura 22 (A e B), as frações de *F. vesiculosus* L. apresentam uma banda na região de 1461  $\text{cm}^{-1}$ , que como visto anteriormente pode ser atribuída a deformação  $\text{CH}_2$  (KACURAKOVA; MATHLOUTHI, 1996).

Para a fração F70Fv o espalhamento de luz atingido foi melhor que na fração F50Fv e por isso a presença das bandas pode ser melhor visualizada nos espectros dessa fração. A banda em 1413  $\text{cm}^{-1}$  na Figura 22 pode ser atribuída a vibração de estiramento  $\text{COO}^-$  e a banda em 1380  $\text{cm}^{-1}$  referente a vibração por estiramento de grupamentos metila (PIELESZ; BINIAS; PALUCH, 2011; MATSUHIRO; ROMÁN; TORRES, 2012).

Figura 22 – Espectros RAMAN das frações polissacarídicas de *F. vesiculosus* L.

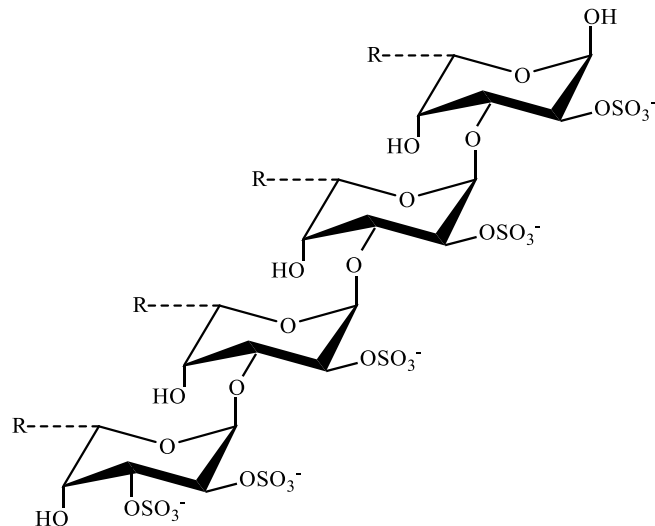


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

De acordo com Pielesz, Biniás e Paluch (2011), que analisaram o fucoidan obtido de *F. vesiculosus* L., as bandas na região de 1337  $\text{cm}^{-1}$  refere-se as vibrações de HCC, HCO e COH,

enquanto a banda em  $1269\text{ cm}^{-1}$  refere-se a vibração por estiramento assimétrico de ésteres de sulfato  $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ . Ainda de acordo com esses autores, bandas na região de  $847\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a vibração da ligação  $\text{C}-\text{O}-\text{S}$  no carbono C-4, em posição axial presente na estrutura dos polissacarídeos sulfatados de *F. vesiculosus* L., conforme Figura 23.

Figura 23 – Estrutura de polissacarídeos sulfatados de *F. vesiculosus* L.



Estrutura de polissacarídeos sulfatados de *F. vesiculosus* L., onde R podem ser diferentes monossacarídeos (manose, galactose, glicose, xilose, ácido urônico entre outros). Fonte: Adaptado (RODRIGUEZ-JASSO et al., 2014)

## 5.2 ATIVIDADES ANTICOAGULANTE E ANTITROMBÓTICA

### 5.2.1 Atividade anticoagulante *in vitro*

#### a) Método USP (1965)

A atividade anticoagulante das frações de polissacarídeos sulfatados das algas - F50UI, F70UI, F50Fv e F70Fv – foi inicialmente determinado pelo método USP (1965), que avalia visualmente a retração do coágulo formado em plasma e pode ser considerado um método de triagem para avaliação da atividade anticoagulante.

Conforme pode ser verificado pela análise da Tabela 6, a atividade anticoagulante foi determinada em triplicata em presença de 50 e 100  $\mu\text{g}$  de cada uma das amostras, como controle positivo utilizou-se a heparina 165 UI (1,5  $\mu\text{g}$ ) e como controle negativo o plasma na ausência de amostra.

Tabela 6 – Atividade anticoagulante – USP (1965)

Amostras	Massa ( $\mu\text{g}$ )	Triplicata		
		A	B	C
Plasma	-	-	-	-
Heparina	1,5	+++	+++	+++
F50UI	50	++	++	++
	100	++	++	++
F70UI	50	+	+	+
	100	+	+	+
F50Fv	50	+	+	+
	100	++	++	++
F70Fv	50	+	+	+
	100	+	+	+

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Pela análise da Tabela 6, percebe-se que a heparina promove a retração total do coágulo em plasma com 1,5  $\mu\text{g}$  em massa, efeito já esperado para um anticoagulante padrão.

Todas as amostras avaliadas foram capazes de contribuir para a retração do coágulo formado quando comparadas ao controle negativo (plasma na ausência de amostra), sendo que essa retração ocorreu de forma mais intensa em presença de 50 e 100  $\mu\text{g}$  da fração F50UI e de 100  $\mu\text{g}$  da fração F50Fv. Os resultados observados permitem sugerir a atividade anticoagulante dessas amostras, sendo, no entanto, necessária a realização de testes mais específicos.

- b) Tempo de tromboplastina parcial ativada, tempo de protombina e tempo de trombina (TTPa, TP, TT)

Para dar continuidade a avaliação da atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados das algas em estudo, foram realizados os testes TTPa, que avalia a via intrínseca, TP, que avalia a via extrínseca e TT que diz respeito a via comum da coagulação sanguínea. Essa análise mais detalhada das vias de coagulação permite avaliar o comportamento das amostras frente as diferentes vias envolvidas na coagulação sanguínea e assim sugerir possíveis caminhos para a atividade anticoagulante das frações testadas. Para realização destes ensaios, a heparina (165 UI) também foi utilizada como controle positivo.

O efeito das amostras sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) está apresentado na Figura 24. Para essa análise considerou-se a razão controle como o tempo de coagulação do plasma na ausência de amostra (28 segundos), sobre ele mesmo, sendo assim essa razão equivalente a 1 (um).

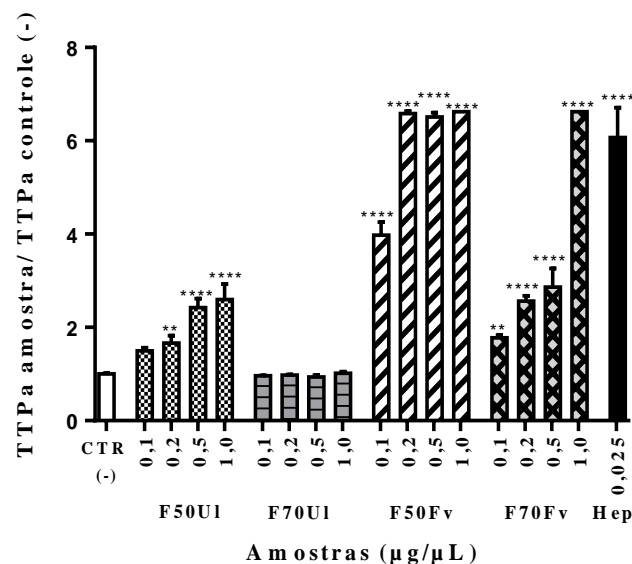
Pela análise da Figura 24 nota-se que quando comparamos a razão entre tempo de coagulação do plasma na presença de cada amostra e o tempo de coagulação do controle

negativo, não são observados efeitos significativos para a fração F70UI em nenhuma das concentrações testadas.

A heparina, por outro lado, na concentração de 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , como já era esperado, apresenta um efeito significativo ( $p < 0,0001$ ), sendo capaz de prolongar o tempo de coagulação em cerca de seis vezes.

Percebe-se que a fração F50UI apresenta um efeito anticoagulante dose dependente, sendo que a partir da concentração 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  esta amostra promove o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da razão TTPa amostra/ TTPa controle. Esse efeito é ainda mais significativo ( $p < 0,0001$ ) nas concentrações de 0,5 e 1,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sendo F50UI responsável por prolongar mais de duas vezes o tempo de coagulação.

Figura 24 – Ensaio TTPa para frações de polissacarídeos sulfatados das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



Tempo de tromboplastina parcial atividade. Os resultados foram expressos como a razão obtida entre o tempo de coagulação da amostra pelo tempo de coagulação do controle negativo. Como controle negativo foi usado o plasma na ausência de amostras e como controle positivo o plasma na presença de heparina. F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70UI: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  e \*\*  $p < 0,05$ . Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Para as frações de *F. vesiculosus* L. foram obtidos resultados significativos no prolongamento do tempo de coagulação em relação ao controle negativo a partir da concentração de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para ambas as frações. Para (F70Fv) foi observado um efeito dose dependente, sendo que na concentração de 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , ocorreu um aumento de três vezes na



razão TTPa amostra/ TTPa controle negativo, enquanto para (F50Fv), na mesma concentração, percebe-se um aumento de cerca de seis vezes nessa razão.

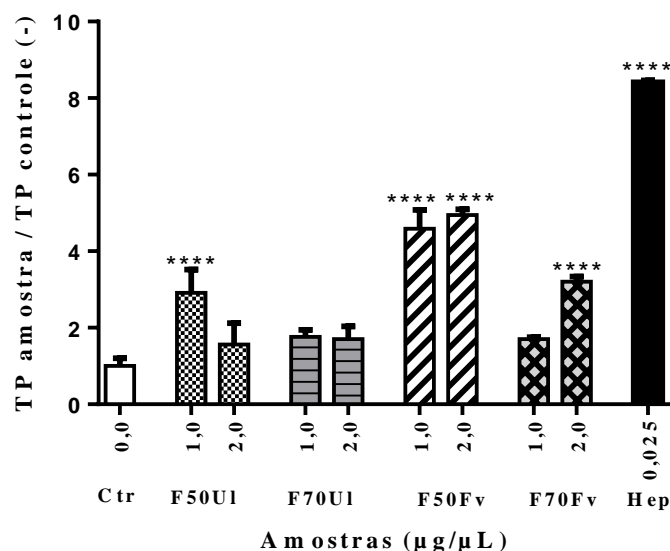
Os resultados do ensaio do tempo de protombina (TP), da via extrínseca, encontram-se apresentados na Figura 25. Para essa análise considerou-se a razão controle como o tempo de coagulação do plasma na ausência de amostra (10 segundos) sobre ele mesmo, sendo assim essa razão equivalente a 1 (um).

A heparina, controle positivo, na concentração de 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , aumentou cerca de oito vezes o tempo de coagulação em relação ao controle.

Da mesma forma que no ensaio TTPa, a fração F70UI não apresenta efeito significativo sobre o prolongamento do tempo de protombina. A fração F50UI, por outro lado, prolonga o tempo de protombina cerca de três vezes em relação ao controle com concentração de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , enquanto que na concentração de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , não são observados efeitos significativos.

Para as frações de *F. vesiculosus* L., por sua vez, percebe-se um efeito significativo no prolongamento do tempo de protombina a partir das concentrações de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para a fração F50Fv, sendo o aumento de cerca de quatro vezes em relação ao controle, enquanto que para a fração F70Fv esse aumento é percebido na concentração de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sendo de cerca de três vezes.

Figura 25 – Ensaio TP para frações de polissacarídeos sulfatados das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.

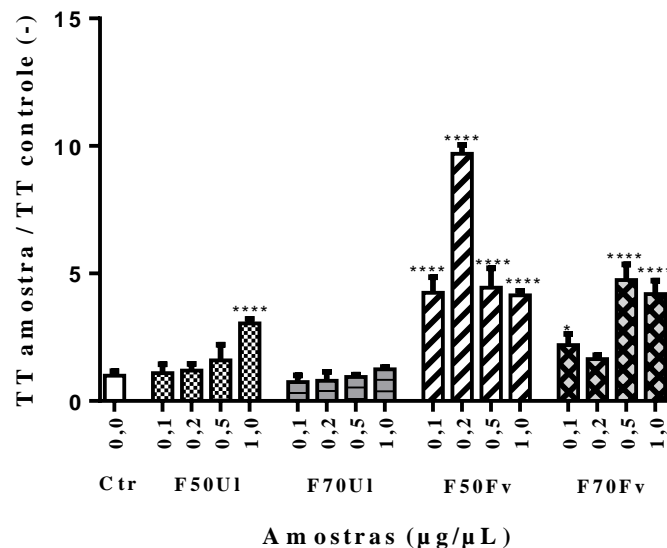


Tempo de protombina. Os resultados foram expressos como a razão obtida entre o tempo de coagulação da amostra pelo tempo de coagulação do controle negativo. Como controle negativo foi usado o plasma na ausência de amostra e como controle positivo o plasma na presença de heparina. F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70UI: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; \*\*\*\* p < 0,0001 e \*\* p < 0,05. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os resultados do ensaio do tempo de trombina (TT), teste que avalia a via comum da coagulação, encontram-se apresentados na Figura 26. Nesse ensaio o plasma em presença da heparina 0,025  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , controle positivo, apresenta-se incoagulável, o que é esperado para um anticoagulante padrão.

A fração F70UI, como já observado para os ensaios TTPa e TP, apresentados anteriormente, também não apresenta efeito sobre a via comum da coagulação. Para as demais amostras, os efeitos mais significativos ( $p < 0,0001$ ), sobre o prolongamento do tempo de coagulação pela via comum, foram observados nas concentrações de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para F50UI, 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para F50Fv e 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para F70Fv.

Figura 26 – Ensaio TT para frações de polissacarídeos sulfatados das algas *F. vesiculosus* L. e *U. lactuca* L.



Tempo de trombina. Os resultados foram expressos como a razão obtida entre o tempo de coagulação da amostra pelo tempo de coagulação do controle negativo. Como controle negativo foi usado o plasma na ausência de amostras e como controle positivo o plasma na presença de heparina. F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70UI: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  e \*  $p < 0,05$ . Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

As análises químicas e espectroscópicas das frações de *U. lactuca* L., já apresentadas nesse trabalho, evidenciaram diferenças nas características estruturais das frações F50UI e F70UI, o que justifica as diferentes atividades anticoagulantes encontradas para essas frações.

Pela revisão de literatura realizada percebe-se que a atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L. não é tão estudada. O estudo de El Back, El Baz e El Baroty (2009) foi o único encontrado relacionado a tal atividade. Esses autores obtiveram

resultados que corroboram com os obtidos no presente trabalho ao avaliar o efeito de dois diferentes extratos de *U. lactuca* L., um extraído em água quente e precipitado com etanol e outro extraído com álcool 85% e precipitado com etanol absoluto, sobre o tempo de coagulação total em presença de trombina e perceberam um prolongamento deste tempo em relação ao controle negativo na presença de 100 µg/mL das amostras.

A atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados de *F. vesiculosus* L., por sua vez, é bastante estudada, sendo muitos os trabalhos encontrados sobre esse assunto. Kwak e colaboradores (2010), por exemplo, ao pesquisar o efeito anticoagulante de um polissacarídeo obtido de *F. vesiculosus* L. de origem comercial perceberam um efeito dose dependente nos testes TTPa, TP e TT, trabalhando nas concentrações (0,5-3,3 µg/mL).

Diferentes espécies de algas exercem efeitos anticoagulantes ou antitrombóticos através de mecanismos distintos (ZHU *et al.*, 2010). De uma forma geral, percebe-se que o teor de sulfato, a natureza da posição da sulfatação, o tipo e a conformação estrutural dos resíduos de monossacarídeos dentro da estrutura de um polissacarídeo podem afetar marcadamente a atividade anticoagulante (LI *et al.*, 2011). Esse fato pode ser percebido ao analisar a fração F70UI, que embora na dosagem química tenha apresentado maior conteúdo de sulfato do que a fração F50UI, não apresentou atividade anticoagulante importante, o que mostra a importância não só do teor de sulfato, mas principalmente do padrão de distribuição e natureza da sulfatação, bem como de resíduos de monossacarídeos que compõem a estrutura do polissacarídeo.

Vale destacar, que em trabalhos anteriores a sulfatação na posição 3 de resíduos de ramnose (WANG *et al.*, 2013; QI *et al.*, 2013) em polissacarídeos de algas verdes foi diretamente associada a atividade anticoagulante observada por esses autores. Como já discutido, a análise química realizada em nosso trabalho, permite sugerir a presença de resíduos de ramnose 3-sulfatada nos polissacarídeos de *U. lactuca* L., o que pode contribuir para a atividade anticoagulante observada para a fração F50UI.

Pela análise dos resultados dos ensaios TTPa, TP e TT observa-se que tanto a fração F50UI de *U. lactuca* L., quanto as de *F. vesiculosus* L. prolongaram o tempo de coagulação com menores concentrações no ensaio TTPa, o que sugere que essas amostras atuam de forma mais intensa sobre a via intrínseca da coagulação.

Sabe-se que via intrínseca é iniciada pela ativação de contato que se inicia com fator XII numa reação envolvendo o cininogênio de alto peso molecular e a pré-caliceína no plasma (WU *et al.*, 2010).

Quando o sangue entra em contato com superfícies carregadas negativamente, como as membranas de células sanguíneas ativadas, o fator FXII sofre alterações conformacionais que

resultam na conversão de pré-caliceína em  $\alpha$ -caliceína, que novamente ativa o fator FXII, além de clivar o cininogênio de elevado peso molecular liberando bradicinina, um potente hipotensor (COCHRANE; REVAK; WUEPPER, 1973; COLMAN *et al.*, 2006). O fator FXII ativado irá clivar FXI em FXIa, que em presença do VIII, irá ativar a via comum da coagulação convertendo o fator FX à FXa, o qual forma um complexo com o fator FVa, que converte protombina em trombina (COLMAN *et al.*, 2006; MULLER *et al.*, 2011).

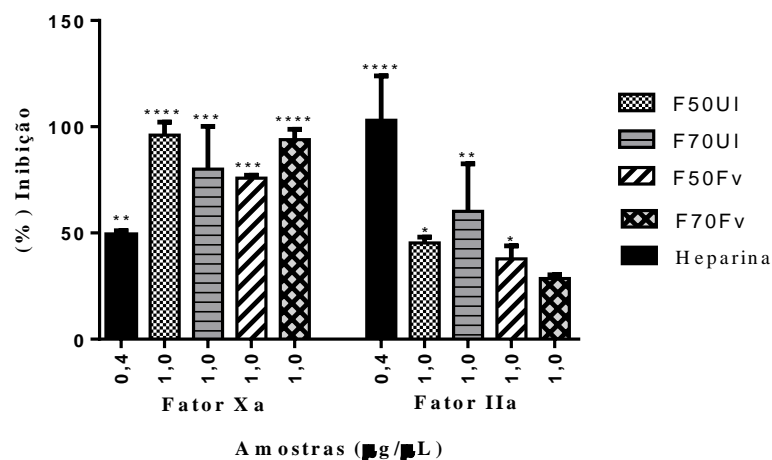
Considerando-se os efeitos observados no ensaio TTPa sugere-se que a atividade dos polissacarídeos sulfatados de alga analisados neste trabalho pode estar relacionada a inibição via antitrombina III de alguma das diferentes proteínas atuantes na via intrínseca da coagulação, que foram expostas anteriormente.

### c) Ensaio cromogênicos: fatores Xa e IIa

Considerando que os fatores Xa e IIa são proteínas fundamentais da cascata da coagulação, envolvidas na formação do coágulo de fibrina a partir de fibrinogênio (MACKMAN, 2008), a avaliação da inibição desses fatores por substâncias de interesse são importantes no entendimento de seus mecanismos anticoagulantes.

A análise do Figura 27 permite notar que a heparina na concentração de 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  inibe de forma significativa a atividade do fator IIa em cerca de 100% ( $p < 0,0001$ ), mas também inibe a atividade do fator Xa em cerca de 50% ( $p = 0,0059$ ).

Figura 27 – Inibição dos fatores Xa e IIa pelas frações de polissacarídeos sulfatados das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição em relação ao branco de cada um dos fatores. F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70UI: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ . Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

As frações de *U. lactuca* L. na concentração de 1 µg/µL inibiram de forma significativa o fator Xa, a saber F50UI inibiu cerca 96% da atividade desse fator ( $p < 0,0001$ ) e F70UI inibiu cerca de 80% ( $p < 0,0001$ ), enquanto que a inibição sobre o fator IIa foi de 45% ( $p < 0,0109$ ) para a fração F50UI e de 60,18% ( $p < 0,0012$ ) para a fração F70UI. Para as frações de *F. vesiculosus* L. na concentração de 1 µg/µL também foi observado um efeito de inibição significativo sobre o fator Xa sendo de cerca de 76% para a F50Fv ( $p < 0,0002$ ) e de 94% para F70Fv ( $p < 0,0001$ ). Sobre o fator IIa a inibição da amostra F50Fv foi de 38% ( $p < 0,0347$ ), enquanto que a inibição de 28% obtida pela fração F70Fv não foi significativa.

Não foram encontrados trabalhos anteriores quanto a análise do efeito dos polissacarídeos sulfatos de *U. lactuca* L. sobre esses fatores da coagulação. Já para *F. vesiculosus* L., Kwak e colaboradores (2010) obtiveram resultados similares ao avaliar o efeito de um polissacarídeo sulfato de *F. vesiculosus* L. sobre a inibição das atividades dos fatores IIa e Xa *in vitro*. Ao avaliarem os polissacarídeos nas concentrações de 1-500 µg/µL, esses autores também perceberam a interferências negativa das amostras sobre as atividades dos fatores da coagulação.

Sabe-se que um dos mecanismos de ação da heparina é pela formação de um complexo com a antitrombina III, aumentando a afinidade de ligação desta molécula com proteínas da coagulação como a trombina (fator IIa) e o fator Xa, o que leva a inibição desses fatores da coagulação e, conseqüentemente, a inibição da conversão de fibrinogênio em fibrina, interferindo na formação do coágulo (NADER *et al.*, 2001; KWAK *et al.*, 2010; SUCHYTA; HANDA; MEYERHOFF, 2014).

É interessante notar que tanto as frações de *U. lactuca* L., quanto as frações de *F. vesiculosus* L. apresentaram maiores percentagens de inibição sobre o fator Xa, mas também inibiram o fator IIa, o que sugere assim como a heparina, a atuação dos polissacarídeos dessas algas possa ocorrer sobre esses fatores via antitrombina III.

Destaca-se aqui, que inibição da atividade do fator Xa, interfere na formação do complexo protrombinase, reduzindo a conversão de protrombina para trombina e interferindo na clivagem de fibrinogênio em fibrina e, conseqüentemente, inibindo a formação do coágulo (MULLER; GAILANI; RENNÉ, 2011).

O quadro apresentado na Figura 28 resume de forma esquemática os efeitos de cada uma das frações em estudo sobre os ensaios realizados para avaliar a atividade anticoagulante.

Figura 28 – Quadro resumo das atividades anticoagulantes das frações polissacarídicas de *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.

	USP	TTPa	TP	TT	Anti-IIa	Anti-Xa
<b>Heparin</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>F50UI</b>	++	++	+	+	+	++
<b>F70UI</b>	-	-	-	-	+	++
<b>F50Fv</b>	++	++	+	++	+	++
<b>F70Fv</b>	++	++	+	++	+	++

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Considerando-se ainda os resultados obtidos no teste TTPa (Figura 28), sugere-se que a atividade anticoagulante pode estar relacionada a inibição de proteínas da via intrínseca da coagulação mediada por antitrombina III, como já discutido anteriormente, no entanto essa inibição pode ocorrer também pelo bloqueio da atividade de outras proteases da coagulação. De acordo com a revisão de Franco (2001), a antitrombina III inibe a trombina, podendo também exercer efeito inibitório sobre diversas outras enzimas da coagulação, incluindo os fatores IXa, Xa, e XIa e, além disso, pode acelerar a dissociação do complexo FVIIa-TF, impedindo a sua reassociação.

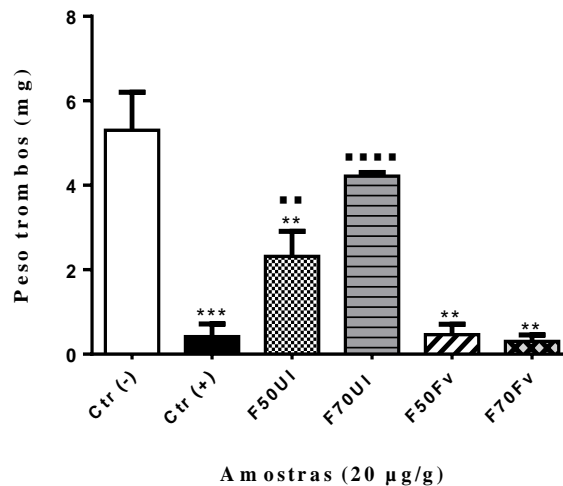
### 5.2.2 Atividade antitrombótica *in vivo*

A atividade antitrombótica, conforme método descrito em material e métodos, foi avaliada em machos *Wistar* pesando entre 180 – 200g, com 70 dias de idade, em modelo de trombose induzida por ligadura da veia cava inferior.

O efeito das frações foi avaliado inicialmente durante 24 horas, após administração venosa (veia caudal) de cada uma das frações na concentração de 20 µg/g. Conforme pode ser verificado pela análise da Figura 29, todas as frações, com exceção de F70UI, reduziram de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o peso dos trombos formados por ligadura da veia cava inferior. Esses resultados concordam com aqueles obtidos nos testes anticoagulantes *in vitro*, nos quais F70UI também não mostrou atividade.

A heparina, controle positivo, na concentração de 1,5 µg/g, após duas horas de administração, como já relatado anteriormente (BARROSO *et al.*, 2008), reduziu, significativamente, o peso dos trombos em cerca de 92% (p 0,0004).

Figura 29 – Atividade antitrombótica *in vivo* das frações cetônicas de *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



As amostras na concentração de 20 µg/g foram avaliadas após 24 horas de exposição. Como controle positivo foi utilizada a heparina 165 UI (1,5 µg/g) após duas horas de administração e como controle negativo animais submetidos a ligadura da veia cava inferior na ausência da aplicação de amostra. F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70UI: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; Ctr (-): Controle negativo; Ctr (+): Heparina; \*\*\*p<0,001 e \*\* p<0,01 – em relação ao controle negativo; \*\*\*\* p<0,0001; \*\* p<0,01 – em relação ao controle positivo. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

As frações F50Fv e F70Fv reduziram o peso dos trombos formados em relação ao grupo controle negativo em cerca de 91% (p 0,0010) e 94% (p 0,0012), respectivamente, e não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle positivo (p>0,05). A alga *F. vesiculosus* L. foi utilizada nesse trabalho como padrão comparativo de atividade, já que essa é uma alga bastante estudada quanto ao seu potencial anticoagulante e antitrombótico.

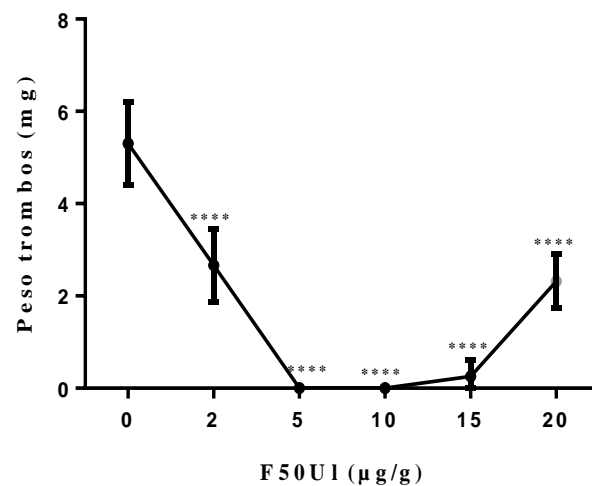
Polissacarídeos sulfatados de *F. vesiculosus* L. já foram reportados anteriormente por sua atividade antitrombótica *in vivo*. Kwak e colaboradores (2010), por exemplo, ao submeterem ratos a um modelo de trombose induzido por cloreto férrico, obtiveram resultados importantes para os polissacarídeos de *F. vesiculosus*, sendo a dose efetiva desses compostos no modelo utilizado foi de 0,54 mg/Kg, inferior à obtida pela heparina de 1,24 mg/kg. Os autores relacionaram a atividade apresentada com a ligação dos polissacarídeos de *F. vesiculosus* ao cofator II da heparina e também a inibição da agregação plaquetária, que foram avaliadas por esses autores *in vitro*.

A fração F50UI, ao contrário de F70UI, apresenta efeitos significativos, reduzindo o peso dos trombos em relação ao grupo controle negativo em cerca de 56% ( $p < 0,0084$ ). Vale destacar que para a alga *U. lactuca* L. não foram encontrados, durante a revisão bibliográfica realizada, trabalhos referentes a atividade antitrombótica, o que ressalta a importância do presente estudo e justifica a continuidade dos testes *in vivo* com a fração F50UI.

Para melhor entender a ação inibitória da fração F50UI sobre a formação dos trombos após ligadura da veia cava inferior em machos *Wistar*, foi realizada uma curva de dose resposta (Figura 30) nas concentrações de 2, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g/g}$ , durante 24 horas de exposição.

Pela análise da Figura 30 percebe-se que há uma redução significativa ( $p < 0,0001$ ) do peso dos trombos em todas as concentrações testadas 2, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g/g}$ , sendo a redução em relação ao grupo controle negativo de 50%, 100%, 100%, 95% e 56%, respectivamente. Essa redução não ocorre de forma dose dependente, sendo que de 2 a 10  $\mu\text{g/g}$  há uma redução crescente no peso dos trombos formados e a partir da concentração de 15  $\mu\text{g/g}$  ocorre um ganho de peso dos trombos.

Figura 30 – Curva de dose resposta da fração F50UI de *U. lactuca* L.



A amostra F50UI foi administrada aos animais nas concentrações de 2, 5, 10, 15 e 20  $\mu\text{g/g}$  e avaliada por 24 horas de ação após administração venosa. Como controle negativo: animais submetidos a ligadura da veia cava inferior na ausência da aplicação de amostra.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Considerando-se que a atividade antitrombótica dos polissacarídeos sulfatados de F50UI pode ser mediada por integrinas da membrana das células endoteliais (MEDEIROS *et al.*, 2012) e que esses polissacarídeos, além de carregados negativamente, possuem alto peso molecular, sugere-se que o comportamento dose específico observado na curva de dose avaliada em 24 horas para essa amostra, pode estar relacionado a mecanismos de competição por receptores de

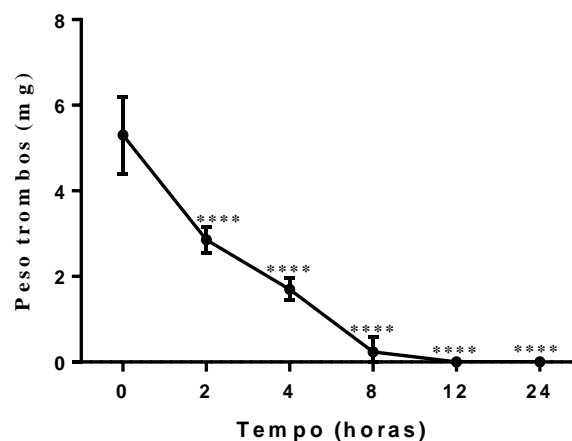


membrana tipo integrina, que provavelmente são acentuados com o aumento da concentração de amostra.

A partir da curva de dose resposta optou-se por realizar a curva de tempo com a concentração de 10 µg/g, já que conforme observado na Figura 30, é um dos pontos onde não há formação de trombo, ou seja, onde o peso do trombo foi igual a zero.

A amostra F50UI, na concentração de 10 µg/g, apresenta um comportamento tempo dependente, sendo que como pode ser verificado na Figura 31, há uma redução significativa ( $p < 0,0001$ ) no peso dos trombos em relação ao grupo controle de 46%, 68% e 95% nos tempos de 2, 4 e 8 horas, respectivamente, até as 12 horas de exposição, a partir de quando não há mais formação de trombos.

Figura 31 – Curva de tempo resposta da fração F50UI de *U. lactuca* L.



A amostra F50UI foi administrada aos animais na concentração de 10 µg/g e avaliada em diferentes tempos de ação (2, 4, 8, 12 e 24 horas) após administração venosa. Como controle negativo: animais submetidos a ligadura da veia cava inferior na ausência da aplicação de amostra. F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; \*\*\*\* $p < 0,0001$ . Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O modelo de indução de trombose por ligadura da veia cava inferior utilizado neste trabalho, pode contribuir para a ativação de contato da via intrínseca da coagulação, isso porque ao realizar a ligadura, há exposição de superfícies carregadas negativamente (membranas) que ativam os fatores da via intrínseca, como o fator FXII e FXI.

Considerando-se os resultados obtidos no ensaio TTPa, que avalia a via intrínseca da coagulação, comentada anteriormente, sugere-se que a atividade antitrombótica observada para os polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L. e de *F. vesiculosus* L. pode estar inicialmente relacionada a inibição de alguma das serino proteases da via intrínseca da coagulação.

A atividade antitrombótica observada pode também, assim como ocorre com a heparina, estar relacionada com a inibição de enzimas da via comum da coagulação como FX e FIIa (NADER *et al.*, 2004) e com o aumento da síntese de heparan sulfato e NO por células endoteliais. (MEDEIROS *et al.*, 2012)

Como já discutido anteriormente, a heparina possui efeito anticoagulante ao reduzir a atividade de serinas da cascata da coagulação por interação via antitrombina III. Além disso, a heparina promove o aumento da síntese de heparan sulfato, um glicosaminoglicano presente na matriz extracelular de células endoteliais, que possui sequencias estruturais específicas, responsáveis por suas funções anticoagulante e antitrombótica (COLBURN; BUONASSISI, 1982; NADER *et al.*, 2004; CASU, NAGGI; TORRI, 2010; MEDEIROS *et al.*, 2012).

Diferentes polissacarídeos sulfatos extraídos de algas marinhas assim como a heparina foram reportados anteriormente por sua atividade antitrombótica.

Os polissacarídeos de parda *Spatoglossum schröderi*, por exemplo, quando avaliados pelo modelo de indução de trombose por ligadura da veia cava, foram capazes de reduzir o peso dos trombos após a administração de 20 µg/g e 24 horas de ação. Os autores avaliaram ainda a síntese de heparan sulfato em cultura de células endoteliais e perceberam que os polissacarídeos que apresentaram efeito antitrombótico *in vivo*, foram capazes de aumentar a síntese deste glicosaminoglicano em relação ao controle (ROCHA *et al.*, 2005; BARROSO *et al.*, 2008). Já os polissacarídeos sulfatados de *F. vesiculosus* L. não foram capazes de aumentar a síntese de heparan sulfato, estando sua atividade possivelmente relacionada a potencialização da atividade do cofator II da heparina (BARROSO *et al.*, 2008).

Os mecanismos moleculares envolvidos na regulação da síntese de heparan sulfato pela heparina em células endoteliais foram estudados por Medeiros e colaboradores (2012) anteriormente. Os autores perceberam que essa regulação é dependente da interação da heparina com integrinas, receptores transmembrana, e que essa interação leva a fosforilação por tirosina de proteínas de adesão como FAK, Src e paxilina e a sinalização via proteínas intracelulares Ras/Raf/MEK MAP/ERK. Além disso, a heparina é capaz de induzir a liberação de Ca<sup>2+</sup> intracelular, PLCγ1 (fosfolipaseCγ1) e a ativação de CaMKII (cálcio calmodulina cinase II), responsáveis pelo aumento na produção de óxido nítrico, que por sua vez participa da regulação da síntese de heparan sulfato, induzindo a mesma.

Destaca-se que os baixos níveis de NO liberados pelas células endoteliais são críticos para a manutenção do tônus vascular. A síntese de NO endotelial é aumentada em resposta a estímulos bioquímicos, incluindo a trombina, o difosfato de adenosina (ADP), serotonina,

acetilcolina, bradicinina, bem como estímulos mecânicos, incluindo a tensão de cisalhamento e tensão cíclica (JIN; LOSCALZO, 2010).

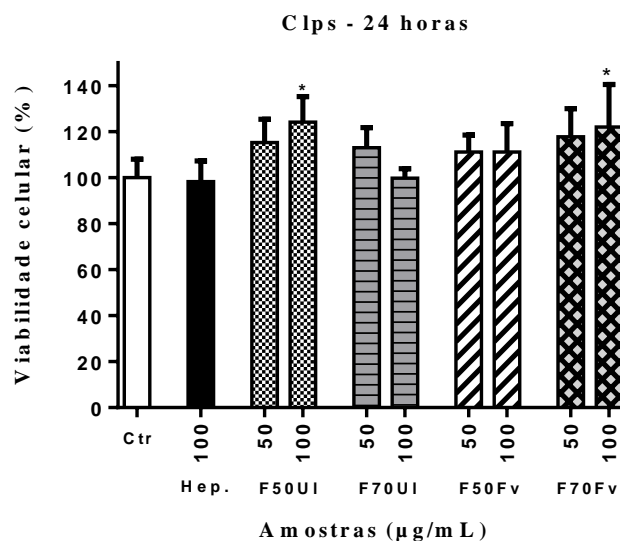
A partir das observações feitas por Medeiros e colaboradores (2012) percebe-se que o óxido nítrico é um intermediário importante na manutenção da homeostasia vascular e por isso decidiu-se realizar a dosagem de óxido nítrico em cultura de células endoteliais de aorta de coelho para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na atividade antitrombótica apresentada pelas frações de polissacarídeos sulfatados em estudo.

### 5.2.3 Dosagem de óxido nítrico em cultura de células endoteliais de aorta de coelho

As frações cetônicas das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L. foram testadas inicialmente sobre células endoteliais (RAEC) nas concentrações de 50 e 100 µg/mL para avaliar possíveis interferências dessas amostras sobre a viabilidade celular da linhagem.

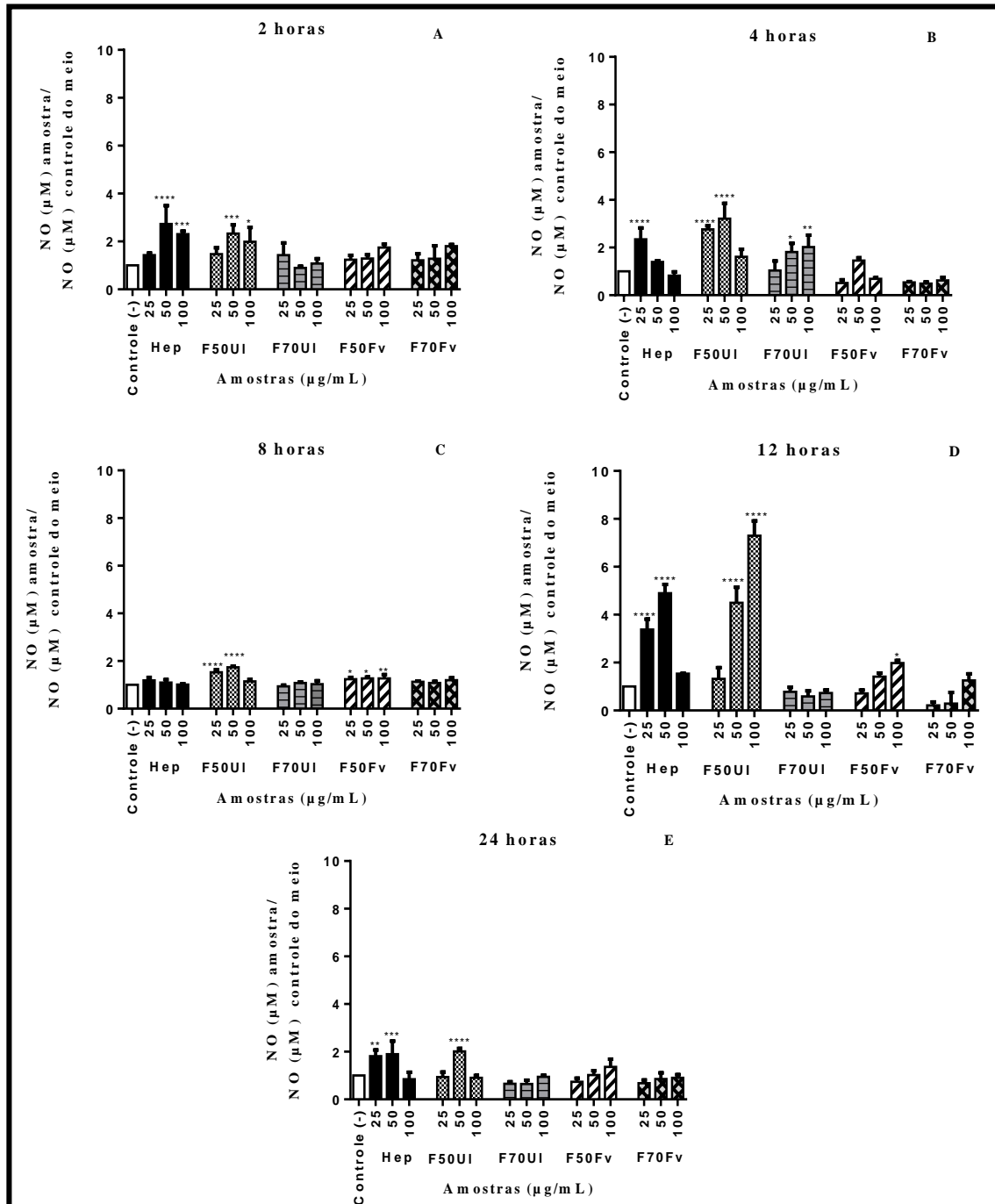
Como pode ser observado na Figura 32, não ocorreu redução na viabilidade das células endoteliais em presença de nenhuma das frações polissacarídicas em estudo. Ao contrário disso, as frações F50UI e F70Fv, na concentração de 100 µg/mL aumentaram em 24,3% e 22,0% a viabilidade dessas células, respectivamente, com  $p < 0,05$ .

Figura 32 – Viabilidade celular da linhagem RAEC em presença das frações de polissacarídeos sulfatados das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle. Como controle foi utilizado células cultivadas em meio F12 (RAEC). 10.000 células/poço; F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70UI: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; \* $p < 0,05$ . Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

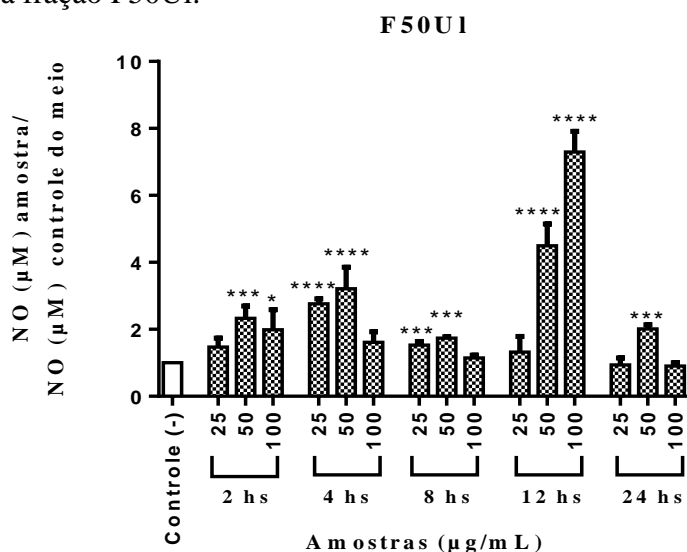
Figura 33 – Dosagem de óxido nítrico em células endoteliais após exposição às frações de polissacarídeos sulfatados das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



Os resultados foram expressos como a razão entre o óxido nítrico (µM) liberado em presença de cada uma das amostras em diferentes concentrações (25, 50 e 100 µg/mL) pelo óxido nítrico (µM) liberado pelo grupo controle, após diferentes tempos de incubação (2, 4, 8, 12 e 24 horas). Como controle foi utilizado o meio de cultivo celular F12 (RAEC). Controle (-): controle negativo; F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70UI: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; \*\*\*\* p<0,0001; \*\*\* p<0,001; \*\* p<0,01; \* p<0,05. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Pela observação da Figura 33 percebe-se que o aumento na produção de NO pelas células endoteliais ocorreu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) após a incubação com a fração F50UI em todos os tempos avaliados, sendo que como pode ser verificado pela análise da Figura 34, esse aumento foi mais expressivo após 12 horas de exposição, chegando a aumentar a razão em mais de sete vezes, quando na presença de 100  $\mu\text{g/mL}$  da fração F50UI.

Figura 34 – Dosagem de óxido nítrico em células endoteliais após exposição à fração F50UI.



Os resultados foram expressos como a razão entre o óxido nítrico ( $\mu\text{M}$ ) liberado em presença da fração F50UI (25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) pelo óxido nítrico ( $\mu\text{M}$ ) liberado pelo grupo controle, após diferentes tempos de incubação (2, 4, 8, 12 e 24 horas). Como controle foi utilizado o meio de cultivo celular F12 (RAEC). Controle (-): controle negativo; F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ . Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A heparina também promoveu o aumento na produção de NO de forma significativa em todos os tempos, com exceção do tempo de 8 horas.

É interessante notar que o aumento na produção de NO não seguiu um perfil dose dependente, sendo que para a maioria dos tempos analisados a liberação de NO na presença da fração F50UI e de heparina na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  foi maior que na presença de 100  $\mu\text{g/mL}$ , no entanto, esse não foi um comportamento geral, visto que após 12 horas de exposição, por exemplo, a taxa de produção de NO em presença da fração F50UI aumentou conforme a dose (Figura 33).

Sabe-se que o endotélio vascular intacto é uma barreira semipermeável que regula o tônus vascular, e libera moléculas como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) para evitar

a agregação de plaquetas ou dilatar os vasos sanguíneos sob condições fisiológicas (CHEN *et al.*, 2015). O NO, mais especificamente, possui efeitos vasorelaxantes, sendo um determinante na saúde vascular, com efeitos antiplaquetário, antitrombótico e propriedades anti-inflamatórias (JIN; LOCALZO, 2010).

O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e da ativação de eNOS endotelial, gera NO durante a conversão de L-arginina a L-citrulina, sendo o penúltimo o principal substrato envolvido na produção de NO (KVIETYS; GRANGER, 2012)

De acordo com Medeiros e colaboradores (2012), a heparina dentre outros mecanismos de ação, atua pela ligação à integrinas nas células endoteliais, promovendo o aumento de cálcio intracelular. O aumento de cálcio está associado ao aumento na atividade de cálcio calmodulina, que por sua vez atua como cofator da enzima óxido nítrico sintase endotelial, resultando no aumento da produção de NO pelas células endoteliais.

Segundo Jin e Loscalzo (2010) a deficiência de NO pode ser atribuída a disponibilidade limitada de seu substrato (arginina) e ou de cofatores, bem como as interações com espécies reativas de oxigênio.

A biodisponibilidade limitada de NO representa o aspecto central da disfunção endotelial, uma anormalidade comum em várias doenças, como a trombose (JIN; LOSCALZO, 2010; CHEN *et al.*, 2015).

Nas células endoteliais, o NO participa da regulação da síntese do proteoglicano heparan sulfato, que é liberado para o sangue e/ou para a matriz extracelular subendotelial, onde possui importantes propriedades antitrombóticas (MEDEIROS *et al.*, 2012).

Segundo Jin e Loscalzo (2010), o NO produzido dentro do citossol das células endoteliais difunde-se rapidamente para as células musculares do tecido liso vascular adjacente, exercendo efeitos parácrinos através da ativação da guanilato ciclase solúvel, aumentando a síntese do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Os níveis aumentados de GMPc no miócito, iniciam as cascatas de sinalização que resultam numa diminuição no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular através da inibição de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes e da fosforilação de proteínas do retículo sarcoplasmático, bem como de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  potássio dependente, que levam a hiperpolarização da membrana de miócitos, reduzindo o efluxo de cálcio. A redução de cálcio dentro das células leva a inibição da formação do complexo cálcio calmodulina nas células musculares do tecido liso vascular, promovendo seu vasorelaxamento.

O óxido nítrico atua também como um agente antiplaquetário endógeno e muito potente devido à sua capacidade de aumentar os níveis de monofosfato de guanosina cíclico dentro de plaquetas, diminuindo assim os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que são necessários para a ativação

das plaquetas e da via comum na cascata de coagulação (SUCHYTA; HANDA; MEYERHOFF, 2014).

Restaurar a produção endógena de NO pelo fornecimento de uma fonte exógena de NO pode ser um atrativo terapêutico para desacelerar a progressão da disfunção endotelial e reduzir o risco de eventos trombóticos ou outros associados a doenças cardiovasculares (JIANG *et al.*, 2012; SUCHYTA; HANDA; MEYERHOFF, 2014).

Considerando o exposto anteriormente, sugere-se que a capacidade da fração de polissacarídeos F50UI de promover o aumento na produção de NO nas células endoteliais, conforme mostrado na pela Figura 34, é um fator importante na atividade antitrombótica apresentada *in vivo* pela mesma fração, de forma semelhante a heparina.

É interessante notar que o aumento mais expressivo na produção de NO pelas células endoteliais foi atingido após 12 horas de incubação, sendo esse o tempo necessário para ocorrer a inibição completa da formação dos trombos pela fração F50UI (10 µg/g) no modelo de trombose *in vivo* realizado.

#### **5.2.4 Dosagem atividade de metaloproteinases em cultura de células endoteliais de aorta de coelho**

Para Nagareddy e colaboradores (2011), as MMPs vasculares, tais como MMP-2 são ativas em condições de resistência à insulina e hipertensão, prejudicando a função endotelial. A disfunção endotelial por sua vez está relacionada com o desenvolvimento de doença cardiovasculares e assim estratégias terapêuticas para melhorar a função endotelial são importantes.

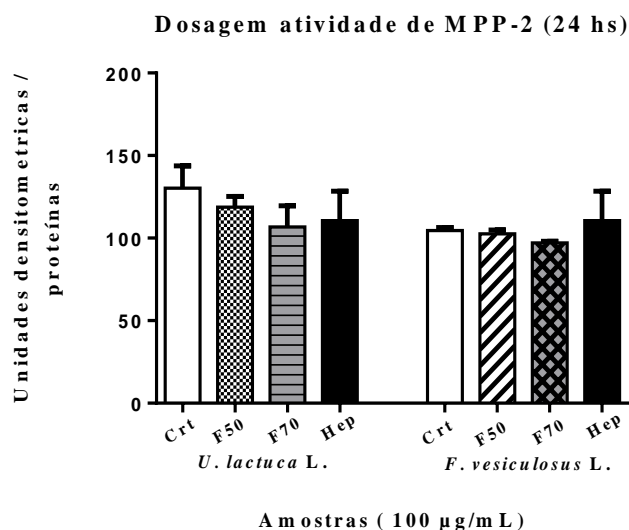
Os autores mencionados anteriormente trabalharam com um modelo de indução de hipertensão por resistência à insulina em ratos alimentados com frutose (FCF) e perceberam que MMP-2 cliva proteoliticamente a matriz extracelular. Eles sugeriram que MMP-2 piora a função endotelial pela degradação proteolítica da NOS endotelial ou mesmo de um de seus cofatores, a proteína (HSP90), e perceberam que a utilização de inibidores de MMP-2 pode melhorar a função do endotélio.

Outras observações interessantes a respeito das MMP-2 foram feitas Momi e colaboradores (2009). Segundo esses autores a ativação plaquetária no local de lesão vascular é essencial para o controle do sangramento, contudo, a ativação excessiva de plaquetas pode resultar na formação indevida de trombos arteriais.

Utilizando modelo de trombose *in vivo* esses autores perceberam que as plaquetas humanas liberam MMP-2 quando ativadas, o que amplifica a resposta de agregação plaquetária e contribui para a formação de trombos. Ainda de acordo com Momi e colaboradores (2009) a inativação do gene MMP-2 pode interromper a formação de trombos induzida pela atividade plaquetária e a utilização de inibidores de MMP-2 representam novas possibilidades de prevenção da trombose.

É interessante notar que no presente estudo (Figura 35), após incubação por 24 horas das células endoteliais com as frações polissacarídicas (F50UI, F70UI, F50Fv e F70Fv) e a heparina, ambos na concentração de 100 µg/mL, não foram obtidas alterações significativas na atividade de MMP-2, nem foram observadas atividades de outras metaloproteínases nos géis de zimograma incubados por 24 horas em tampão de incubação.

Figura 35 – Dosagem da atividade de MMP-2 em cultura de células endoteliais de aorta de coelho após incubação com polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



Os resultados foram expressos em unidades densitométricas de cada uma das bandas nos géis de zimograma incubados por 24 horas por proteínas. O experimento foi realizado por incubação das células endoteliais de aorta de coelho com as amostras (100 µg/mL) por 24 horas na ausência de outros estímulos. Como controle foi utilizado células cultivadas em F12. Ctrl: controle; F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70UI: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; significância  $p < 0,05$ . Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A ausência de efeitos significativos sobre a atividade de MMP-2 na cultura de células endoteliais de aorta de coelho (Figura 35), em presença das frações polissacarídicas avaliadas no presente estudo, concorda com os resultados obtidos na avaliação da viabilidade dessas células, a qual também não foi influenciada por essas amostras.



Além disso, considerando os resultados de Nagareddy e colaboradores (2011) e de Momi e colaboradores (2009), destaca-se que embora não ocorra de forma significativa, há uma tendência na redução da atividade de MMP-2 em presença das amostras, o que corrobora com os efeitos observados na dosagem de óxido nítrico e com as atividades sobre a coagulação sanguínea, anteriormente, apresentadas.

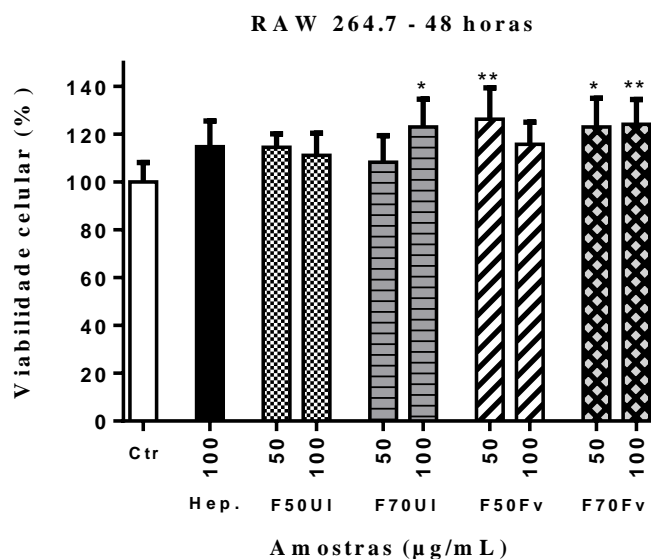
### 5.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

#### 5.3.1 Dosagem de óxido nítrico em cultura de macrófagos RAW 264.7

As frações cetônicas das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L. foram testadas inicialmente sobre macrófagos (RAW 264.7) nas concentrações de 50 e 100 µg/mL para avaliar possíveis interferências dessas amostras sobre a viabilidade celular dessa linhagem.

Como pode ser observado na Figura 36, nenhuma das frações de polissacarídeos em estudos interferiram de forma negativa na viabilidade das células RAW 264.7, sendo que as frações F70UI (100 µg/mL), F50Fv (50 µg/mL) e F70Fv (50 e 100 µg/mL) aumentaram a viabilidade dessas células de forma significativa ( $p < 0,05$ ) em cerca de 22,9%, 26,3%, 22,9% e 24,2%, respectivamente.

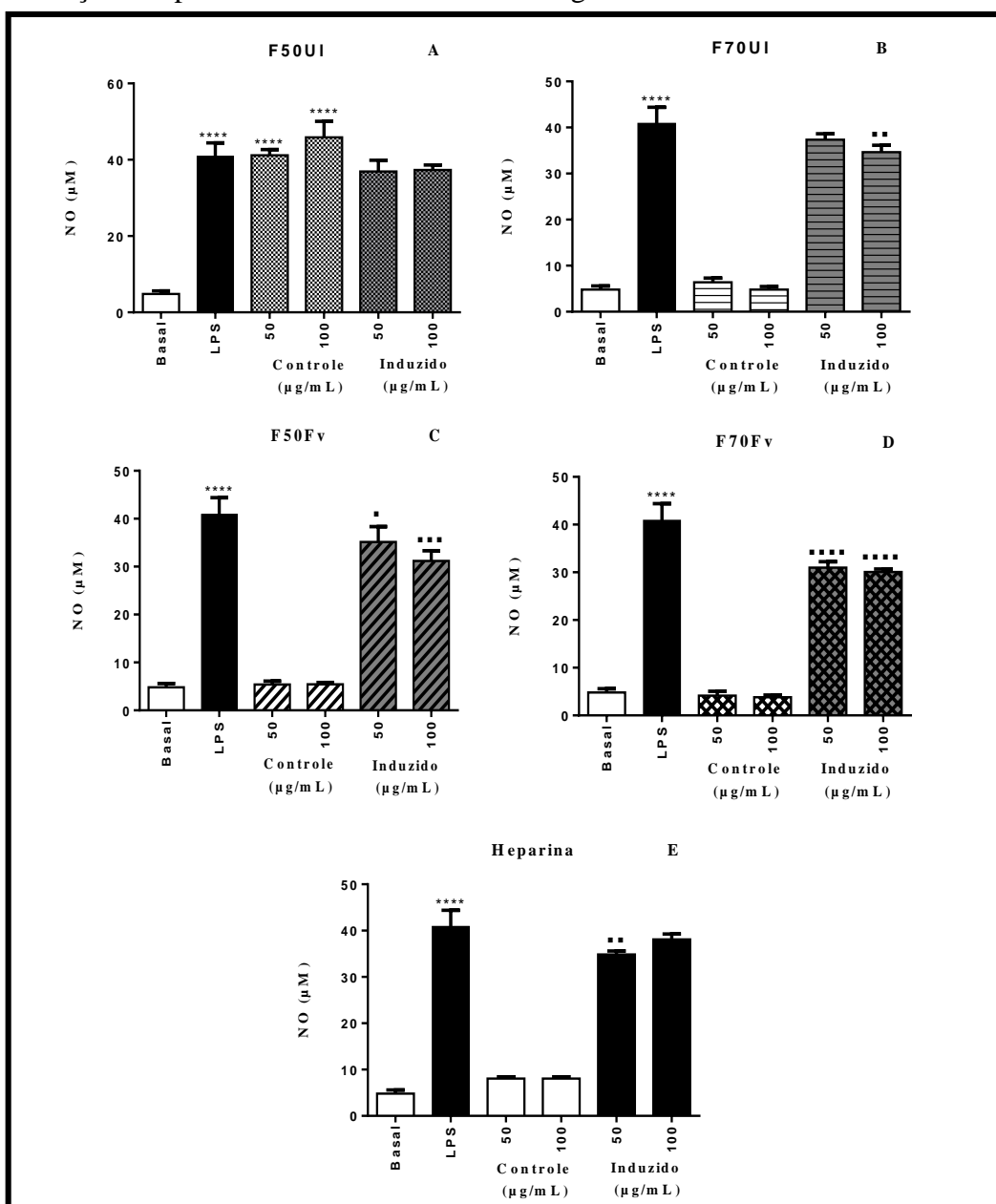
Figura 36 – Viabilidade celular da linhagem RAW 264.7 em presença das frações de polissacarídeos sulfatados das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle. Como controle foi utilizado células cultivadas em meio DMEM (RAW 264.7). 10.000 células/ poço; F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70UI: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ . Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Sabe-se que durante a inflamação os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos ativando os leucócitos através da liberação de moléculas coestimulatórias como citocinas pró-estimulatórias e de espécies de oxigênio como o óxido nítrico (CRUVINEL *et al.*, 2010; ABBAS; LICHTMAN, 2012).

Figura 37 – Dosagem de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 após exposição às frações de polissacarídeos sulfatados das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



Os resultados foram expressos como a razão entre o óxido nítrico ( $\mu\text{M}$ ) liberado em presença de cada uma das amostras (50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) pelo óxido nítrico ( $\mu\text{M}$ ) liberado pelo grupo controle, após 48 horas de incubação. Como controle foi utilizado células cultivadas em DMEM e como controle induzido células induzidas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$ ). Basal: controle; LPS: controle induzido; F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70UI: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  – em relação ao controle negativo; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  – em relação ao controle positivo. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO

O NO, mediador inflamatório, é produzido principalmente por células endoteliais, como já discutido, e por macrófagos. Nessas últimas células, o NO é produzido pela sintetase do óxido nítrico induzível (iNOS), que é induzida por ativação de receptores *toll-like* (TLR) em resposta a padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), especialmente na presença de INF- $\gamma$  (CRUVINEL *et al.*, 2010).

Com intuito de avaliar a ação das frações de polissacarídeos sulfatados de *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L. sobre a modulação do processo inflamatório mediada por NO, realizou-se o ensaio em cultura de macrófagos na presença e na ausência de estímulo por LPS.

Lipopolissacarídeos bacterianos e fúngicos têm sido utilizados para estimular macrófagos (NACIFE *et al.*, 2004; CAIVANO *et al.*, 2000). Pela análise da Figura 37 é possível perceber que o LPS (controle positivo) estimulou significativamente ( $p < 0,0001$ ) a liberação de NO pelos macrófagos, levando a um aumento na produção de NO de cerca de nove vezes em relação ao controle basal.

Ao comparar os grupos controle de cada uma das amostras, ou seja, grupos nos quais as células foram incubadas com polissacarídeos de algas diluídos em meio DMEM nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  e na ausência de estímulo por LPS, com o grupo basal (células cultivadas apenas com DMEM), nota-se que as frações F70UI, F50Fv, F70Fv e a heparina não interferiram na produção de óxido nítrico.

A fração F50UI, por outro lado, estimulou de forma significativa a produção de NO pelos macrófagos, sendo esse aumento nove vezes maior em relação ao controle basal ( $p < 0,0001$ ).

Esse resultado é interessante e concorda com trabalhos anteriores que demonstraram a atividade de polissacarídeos sulfatados de algas do gênero *Ulva* como estimuladores da produção de NO por macrófagos.

Polissacarídeos ácidos extraídos de *Ulva rígida*, por exemplo, induziram o aumento na produção de NO por macrófagos, sendo essa resposta relacionada a um aumento na expressão da enzima iNOS, enzima que metaboliza L-arginina a L-citrulina e NO e também induziram níveis elevados de prostaglandinas E2, vinculados ao aumento na expressão de COX-2, enzima que catalisa a conversão de o ácido araquidônico a prostaglandinas. Os autores perceberam que após dessulfatação a atividade apresentada pelos polissacarídeos foi reduzida, o que demonstra a importância do grupo sulfato nessa atividade (LEIRO *et al.*, 2007).

No trabalho de Tabarsa e colaboradores (2012), polissacarídeos foram extraídos de *U. pertusa* com água quente, precipitados com etanol e fracionados por cromatografia de troca iônica. Foram obtidas, dessa forma, três frações diferentes, sendo que duas delas nas

concentrações (1,56; 6,25 e 12,5 µg/mL) foram responsáveis por estimular de forma mais significativa a produção de NO por células RAW 264.7. Os autores relacionaram as diferentes atividades encontradas com diferentes graus de sulfatação e diferentes pesos moleculares das frações, e também perceberam um aumento na expressão das enzimas iNOS e COX 2, em presença das frações mais ativas.

Ao compararmos os resultados da dosagem de NO de cada uma das frações em presença de estímulo por LPS com o grupo controle induzido por LPS, nota-se que todas as frações polissacarídicas, com exceção de F50UI, reduziram de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a liberação de NO em relação ao controle induzido. Essa redução foi de 15% para F70UI (100 µg/mL), de 14% e 24% para F50Fv (50 e 100 µg/mL) e de 24% e 27% para F70Fv (50 e 100 µg/mL).

Polissacarídeos sulfatados ricos em fucose, extraídos de algas pardas, em concentrações de 30 a 100 µg/mL, foram capazes de inibir a produção de NO por células RAW 264.7 estimuladas com LPS. As análises por *Western blot* revelaram uma redução da expressão da proteína óxido nítrico sintase indutível e uma supressão da síntese dessa enzima em macrófagos estimulados com LPS (YANG *et al.*, 2006).

Os polissacarídeos sulfatados de *F. vesiculosus* foram também responsáveis por suprimir a expressão aumentada de COX-2 pró-inflamatória e a produção de NO em ratos e células HepG2, após exposição ao álcool (LIM *et al.*, 2015). Além disso, o tratamento com esses polissacarídeos inibiu de forma significativa a produção excessiva de NO e PGE2 em células da micróglia estimuladas com LPS e atenuaram a expressão das enzimas iNOS e COX-2.

Pela análise da Figura 37, percebe-se também que a heparina não interfere na produção de NO na ausência do LPS, enquanto que na presença do LPS, na concentração de 50 µg/mL, houve uma redução de 15% ( $p < 0,05$ ) na produção de NO pelos macrófagos em relação ao controle induzido com LPS.

Os resultados obtidos demonstram o efeito dos polissacarídeos investigados sobre a produção de NO em cultura de macrófagos, com base nisso, buscamos investigar melhor o comportamento destes polissacarídeos sulfatados sobre a inflamação.

### 5.3.2 Dosagem de interleucina em cultura de macrófagos RAW 264.7

De acordo com Jiao e colaboradores (2009) a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, e de PGE2 é fundamental à recuperação de células e/ou tecidos lesionados através da estimulação do sistema imune. Por outro lado, citocinas anti-inflamatória, tais como IL-4, IL-10 e IL-12 também são importantes para evitar os efeitos prejudiciais da ativação de macrófagos (CHOI *et al.*, 2005). Isso porque a secreção excessiva de citocinas pró-inflamatórias por ativação sem controle dos macrófagos pode ser prejudicial a reparação de células e tecidos danificados, agravando a inflamação.

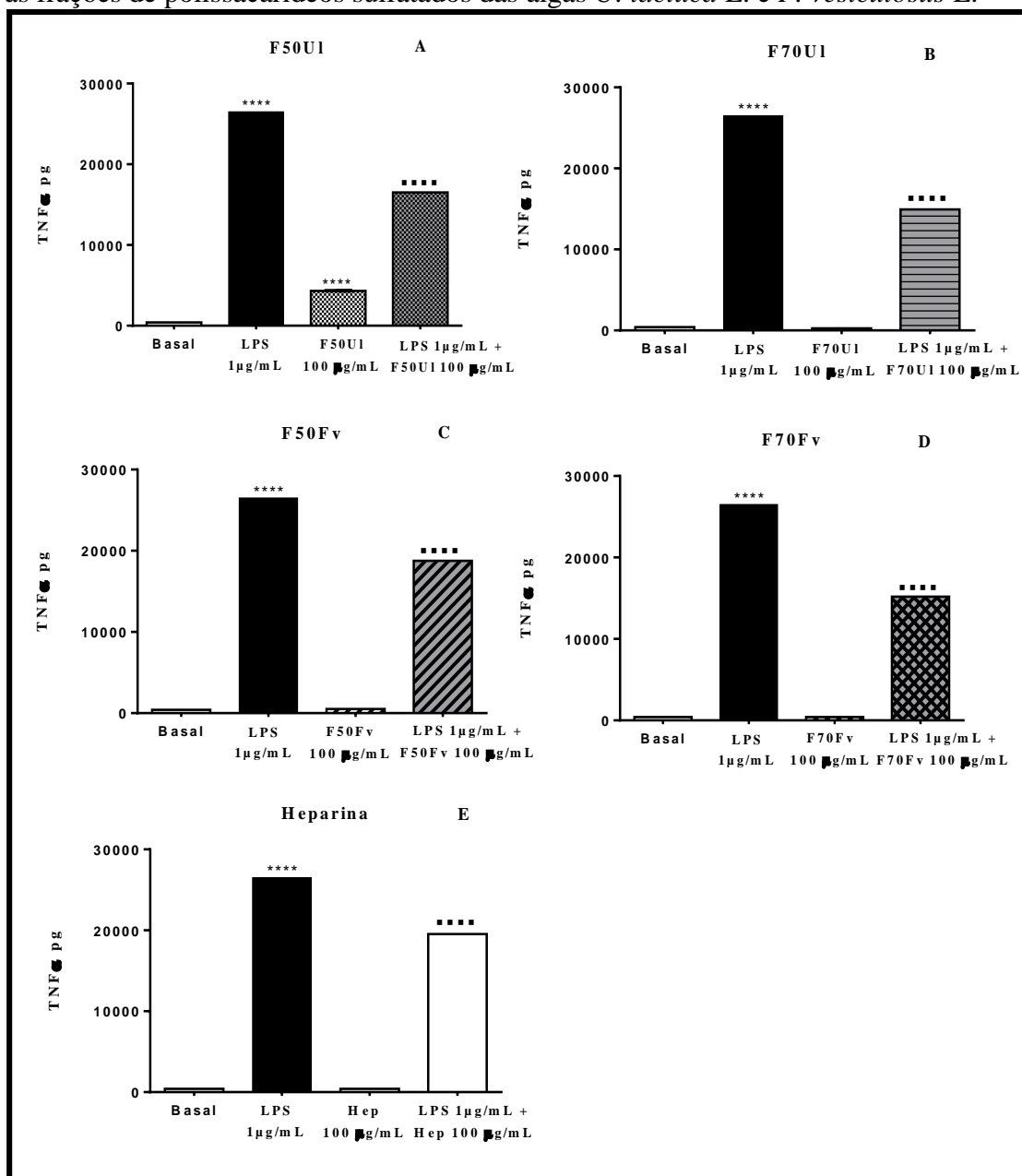
Muitos polissacarídeos obtidos a partir de fontes naturais são considerados como modificadores de resposta biológicos e têm contribuído de forma positiva para respostas imunitárias (LI *et al.*, 2008).

Pela Figura 38 é possível observar que todas as amostras na concentração de 100  $\mu$ g/mL, inclusive a heparina, reduziram de forma significativa ( $p < 0,0001$ ) a produção de TNF- $\alpha$  na cultura estimulada com 1  $\mu$ g/mL de LPS, o que demonstra um caráter anti-inflamatório dessas amostras, visto que essa é uma citocina de pró-inflamatória.

A redução de TNF- $\alpha$  em relação ao controle estimulado com LPS foi de 38%, 44%, 29%, 42% e 26% para as frações F50UI, F70UI, F50Fv, F70Fv e para heparina, respectivamente.

A fração F50UI, por outro lado, foi capaz de estimular a produção de TNF- $\alpha$  na ausência de estímulo com LPS, provocando um aumento de cerca de onze vezes na produção em picogramas dessa citocina, com  $p < 0,0001$ . Esse resultado corrobora aquele obtida na dosagem de NO, onde a fração F50UI também promoveu esse estímulo inflamatório.

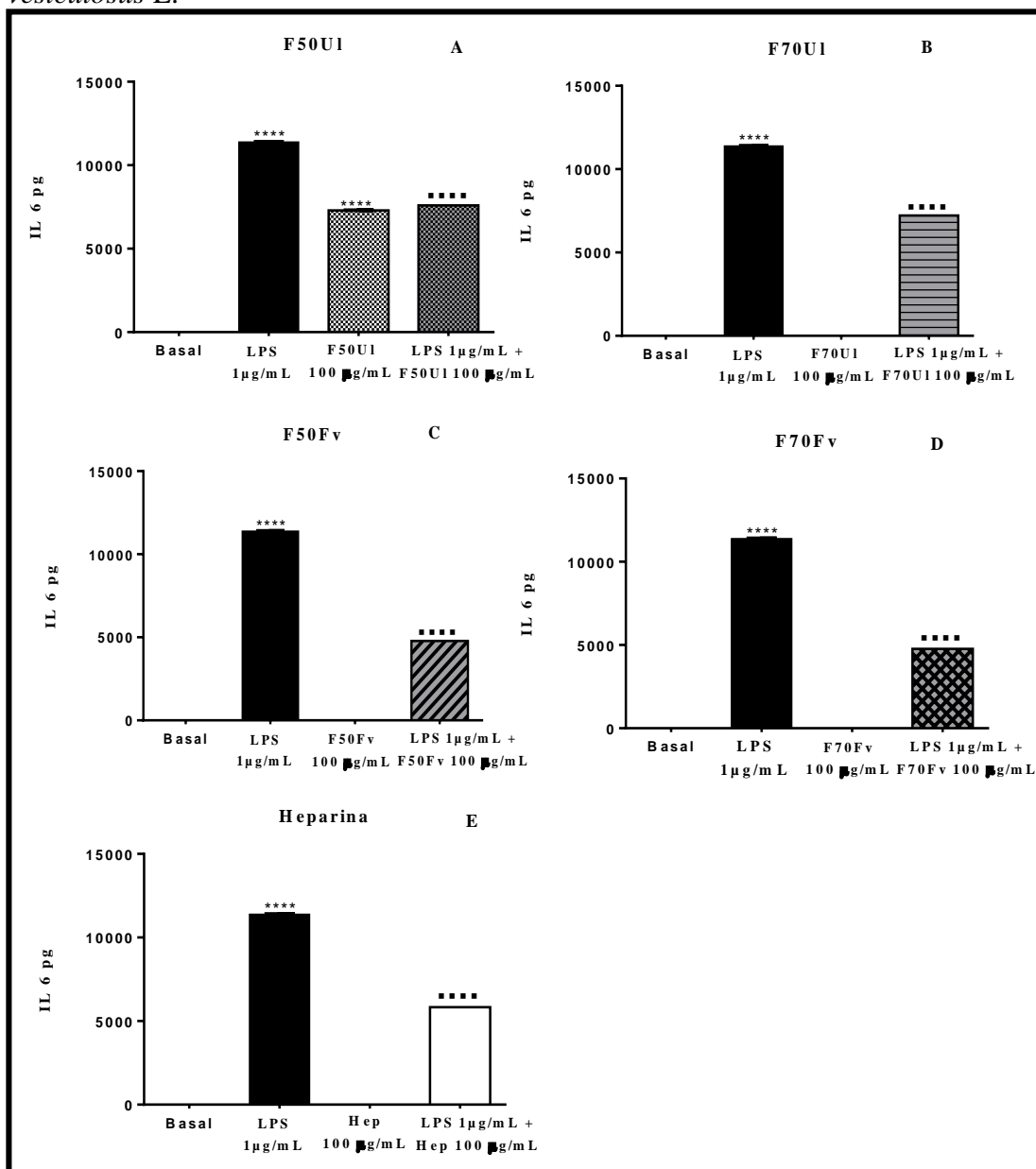
Figura 38 – Dosagem de TNF- $\alpha$  em cultura de macrófagos RAW 264.7 após exposição às frações de polissacarídeos sulfatados das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



Os resultados foram expressos em picogramas de TNF- $\alpha$  liberadas para o meio em presença de cada uma das amostras (100  $\mu$ g/mL) após 48 horas de incubação na presença e na ausência de estímulo por LPS (1  $\mu$ g/mL). Como controle foi utilizado células cultivadas em DMEM e como controle induzido células induzidas com LPS (1  $\mu$ g/mL). Basal: controle; LPS: controle induzido; F50U1: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70U1: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; \*\*\*\* p<0,0001 – em relação ao controle negativo; \*\*\*\*\* p<0,0001 – em relação ao controle positivo. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Na Figura 39 encontram-se apresentados os resultados referentes a dosagem da Interleucina 6, que assim como TNF- $\alpha$  é uma interleucina de caráter pró-inflamatório.

Figura 39 – Dosagem de interleucina IL-6 em cultura de macrófagos RAW 264.7 após exposição às frações de polissacarídeos sulfatados das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



Os resultados foram expressos em picogramas de IL-6 liberadas para o meio em presença de cada uma das amostras (100 µg/mL) após 48 horas de incubação na presença e na ausência de estímulo por LPS (1 µg/mL). Como controle foi utilizado células cultivadas em DMEM e como controle induzido células induzidas com LPS (1 µg/mL). Basal: controle; LPS: controle induzido; F50U1: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70U1: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; \*\*\*\* p<0,0001 – em relação ao controle negativo; \*\*\*\* p<0,0001 – em relação ao controle positivo. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O comportamento obtido pelas frações na dosagem de IL-6 concorda com aqueles já observados na análise da dosagem de NO e de TNF- $\alpha$ . Todas amostras foram responsáveis pela

redução significativa ( $p < 0,0001$ ) de IL-6 em relação ao controle estimulado com LPS, sendo essa redução de 33%, 37%, 58%, 58% e 49% para as frações F50UI, F70UI, F50Fv, F70Fv e heparina, respectivamente.

A fração F50UI, assim como nas dosagens apresentadas anteriormente, estimulou a produção de IL-6 de forma significativa ( $p < 0,0001$ ), sendo mais uma vez capaz de induzir o processo inflamatório.

Trabalhos anteriores com polissacarídeos de algas utilizando modelos de inflamação em culturas de células corroboram com os nossos resultados.

Polissacarídeos sulfatados de algas do gênero *Ulva*, mais especificamente da espécie *U. pertusa* (1,56 -12,5  $\mu\text{g/mL}$ ), foram reportados anteriormente por estimular a expressão de RNAm de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 (TABARSA; LEE; YOU, 2012).

Já um fucoidan adquirido comercialmente e utilizado como pré-tratamento foi capaz de atenuar as lesões gástricas induzidas por aspirina (400 mg/kg de peso corporal) em ratos. Os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-12, bem como de TNF- $\alpha$  e de IFN- $\gamma$ , que se encontravam elevados após tratamento com aspirina, foram controlados pelo pré-tratamento com fucoidan, com exceção dos níveis de IL-6. Além disso, o pré-tratamento com fucoidan atenuou, significativamente, a queda promovida pela aspirina nos níveis de IL-10, enquanto a diminuição nos níveis de IL-4 não foi alterada (RAGHAVENDRAN, SRINIVASAN e REKH, 2011).

Polissacarídeos sulfatados de *Sargassum hemiphyllum*, outra alga parda, também foram capazes de modular a inflamação, apresentando efeito anti-inflamatórios quando avaliados em linhagem de macrófagos (RAW 264.7) induzidos por lipopolissacarídeo (LPS), o mesmo utilizado no presente trabalho. Os perfis de secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , foram significativamente reduzidos após incubação com 1-5 mg/mL dos polissacarídeos de *S. hemiphyllum*. A análise de RT-PCR sugeriu a inibição das expressões RNAm de IL- $\beta$ , iNOS e COX-2 induzidos por LPS. As propriedades anti-inflamatórias desses polissacarídeos foram atribuídas a regulação de NF-kB nos núcleos (HWANG *et al.*, 2011). Segundo Beinke e Ley (2004) quando as células são estimuladas por LPS, o NF-kB é translocado para o núcleo e modula a expressão genética.

Sabe-se que tanto as substâncias que estimulam quanto as que regulam a atividade dos macrófagos podem ter aplicações biomédicas, podendo ser usadas como imunoestimulantes ou como imunomoduladores de efeitos negativos associados a resposta imunológica e assim apresentar efeitos anti-inflamatórios (LEIRO *et al.*, 2007). Dessa forma, com relação as frações



polissacarídicas de *U. lactuca* L. e de *F. vesiculosus* L. se fazem necessários mais estudos sobre a ação destes polissacarídeos no processo inflamatório.

### 5.3.3 Dosagem atividade de metaloproteinases em cultura de macrófagos RAW 264.7

MMP-2 é uma enzima constitutiva encontrada em quase todos os tipos de células, sendo responsável pela degradação do colágeno desnaturado (gelatina) e colágeno tipo IV (um componente da membrana basal), bem como outras proteínas de matriz extracelular (MORRISON *et al.*, 2009; SAWICKI, 2013). A MMP-9 é uma metaloproteinase induzida por citocinas, sendo mais comumente localizada nos leucócitos (IWATA *et al.*, 2007).

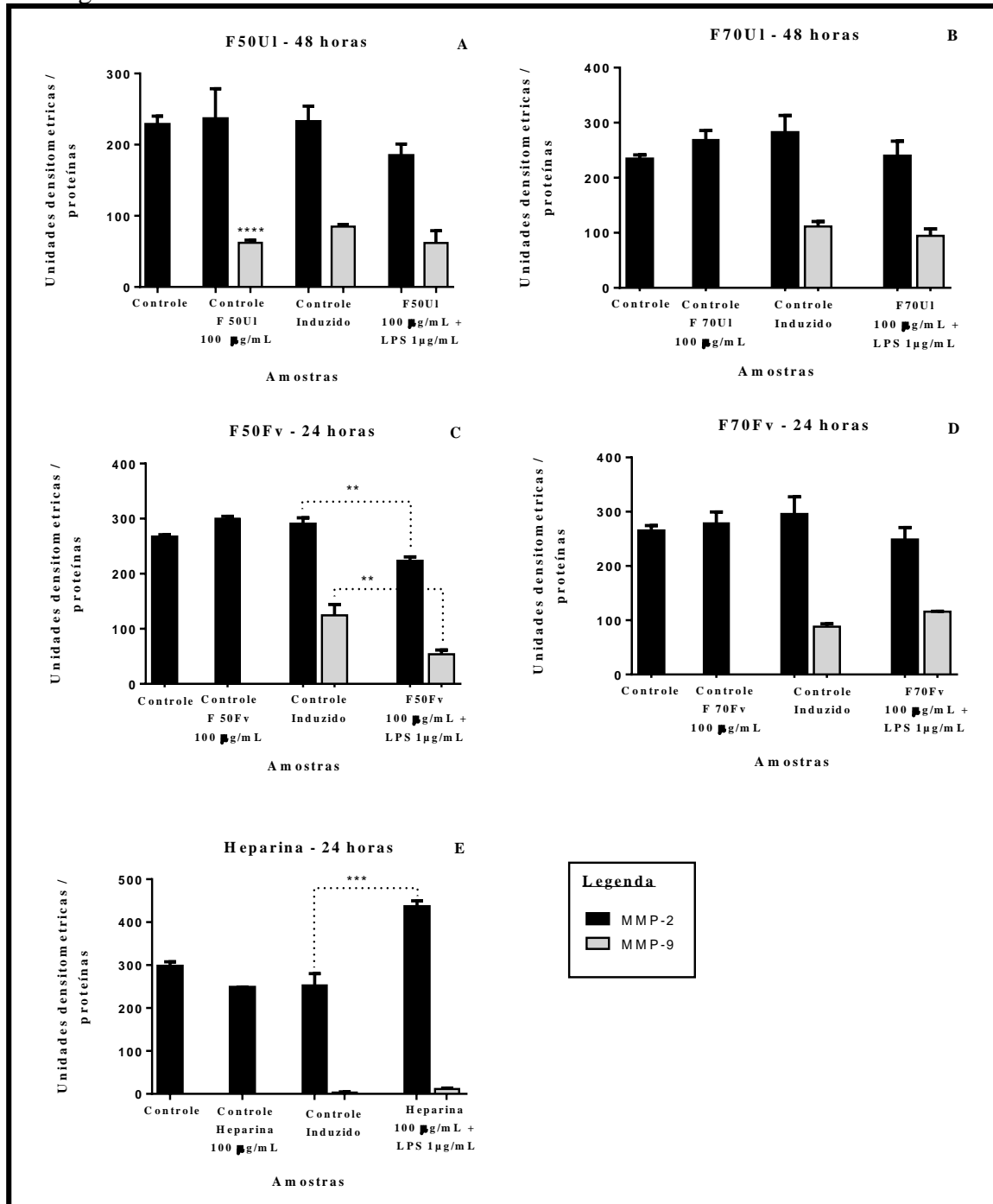
A análise da atividade de metaloproteinases em cultura de células RAW 264.7, como já descrito em matérias e métodos, foi realizada após 24 horas de incubação dessas células com cada uma das frações de polissacarídeos em estudo e com a heparina. Os géis de zimograma de cada uma das amostras, por sua vez, foram incubados por 24 e 48 horas em tampão de incubação. Para as frações de *U. lactuca* L. a incubação em tampão de incubação por 48 horas permitiu a melhor observação e análise das atividades das metaloproteinases nos géis, enquanto que para as frações de *F. vesiculosus* L. e de heparina a melhor análise foi a dos géis incubados por 24 horas.

Pela Figura 40 nota-se que macrófagos incubados com LPS (1µg/mL) apresentaram atividade de MMP-2 e MMP-9, enquanto que os macrófagos RAW 264.7 na ausência de estímulo por LPS não apresentam a atividade de MMP-9.

Na Figura 40A percebe-se que os polissacarídeos de F50UI (100 µg/mL), na ausência de estímulo por LPS e após 24 horas de incubação com a linhagem de células RAW 264.7, induzem a atividade de MMP-9, o que não é observada no grupo controle.

Para Tomlinson e colaboradores (2008) a secreção de MMP-9 é aumentada em resposta a estímulos inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ . Esse fato justifica os resultados apresentados sobre a atividade de MMP-9 pela fração F50UI, considerando que os polissacarídeos dessa fração também induziram a liberação de TNF-  $\alpha$  em cultura de células RAW 264.7.

Figura 40 – Dosagem da atividade de metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 em cultura de macrófagos RAW 264.7 após incubação com as frações de polissacarídeos sulfatados das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L.



Os resultados foram expressos em unidades densitométricas de cada uma das bandas nos géis de zimograma incubados por 48 horas (F50UI e F70UI) e por 24 horas (F50Fv, F70Fv e heparina) pela dosagem de proteínas. O experimento foi realizado por incubação das células RAW 264.7 com as amostras (100 µg/mL) por 24 horas na ausência de estímulos e na presença de estímulo por LPS (1µg/mL). Como controle foi utilizado células cultivadas em DMEM e como controle induzido células induzidas com LPS (1µg/mL). Basal: controle; LPS: controle estimulado; F50UI: Fração F50 de *U. lactuca* L.; F70UI: Fração F70 de *U. lactuca* L.; F50Fv: Fração F50 de *F. vesiculosus* L.; F70Fv: fração F70 de *F. vesiculosus* L.; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os polissacarídeos de F50Fv (Figura 40C), na concentração de 100 µg/mL, por sua vez, após incubação de 24 horas com macrófagos estimulados com LPS (1 µg/mL) são capazes de reduzir de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a atividade de MMP-9 em 57%, quando comparados ao grupo controle estimulado.

A MMP-9 é um mediador chave de destruição tecidual em muitas doenças marcadas por dano tecidual inflamatório como, por exemplo, aterosclerose, esclerose múltipla, e artrite reumatoide (TAUBER *et al.*, 2012). De acordo com esses autores, a inibição de MMP-9 parece ser uma estratégia promissora para tratamento de doenças inflamatórias. Considerando o exposto por esses autores os resultados obtidos para polissacarídeos de F50Fv são sugestivos de um efeito anti-inflamatório dessa amostra.

Já os polissacarídeos de F70U1 e F70Fv (Figura 40 B e D), na concentração de 100 µg/mL, não apresentam respostas significativas sobre a atividade de MMP-9, quando comparados aos grupos controle e controle induzido.

A heparina (100 µg/mL), Figura 40E, após incubação de 24 horas, foi capaz de aumentar a atividade MMP-2 ( $p < 0,05$ ), o que é percebido quando se faz a comparação entre as células induzidas e incubadas com heparina e as células do grupo controle induzido.

Os polissacarídeos de F50Fv reduziram de forma significativa ( $p < 0,05$ ) em 23% a atividade de MMP-2 em macrófagos estimulados com LPS, quando comparados ao controle estimulado. As demais frações polissacarídicas, por sua vez, não apresentaram resultados significativos ( $p < 0,05$ ) sobre MMP-2 em relação aos grupos controle e controle induzido por LPS.

Segundo Berry e colaboradores (2015) MMP-2 é uma proteína importante na manutenção da resposta imune, sendo que sua deficiência torna seres humanos e ratos susceptíveis a inflamação. Essa metaloproteinase pode modular a resposta inflamatória através de secreção fosfolipase A2, uma hidrolase que libera ácidos graxos, incluindo precursores de eicosanoides. Dessa forma, é interessante uma manutenção da atividade de MMP-2, o que foi observado para a maioria das frações de polissacarídeos em análise.

Figura 41 - Quadro resumo dos efeitos das frações polissacarídicas sobre mediadores inflamatórios

	NO	TNF- $\alpha$	IL-6	MMP-2	MMP-9	
<b>Heparina</b>	-	-	-	-	-	
<b>F50UI</b>	↑	↑	↑	-	↑	
<b>F70UI</b>	-	-	-	-	-	
<b>F50Fv</b>	-	-	-	-	-	
<b>F70Fv</b>	-	-	-	-	-	
LPS	<b>Heparina</b>	↓	↓	↓	↑	-
	<b>F50UI</b>	-	↓	↓	-	-
	<b>F70UI</b>	↓	↓	↓	-	-
	<b>F50Fv</b>	↓	↓	↓	↓	↓
	<b>F70Fv</b>	↓	↓	↓	-	-

O quadro apresentado na Figura 41 resume de forma esquemática os efeitos de cada uma das frações em estudo sobre mediadores inflamatórios. Por esse quadro fica evidente o comportamento da fração F50UI, capaz de estimular todos os mediadores pró-inflamatórios avaliados.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- ✓ O processo de extração enzimática com alcalase seguido por fracionamento com acetona, empregado neste trabalho, foi satisfatório para extração de heteropolissacarídeos sulfatados e carboxilados de elevado peso molecular das algas *U. lactuca* L. e *F. vesiculosus* L., sendo esses polissacarídeos constituídos por ramnose, galactose, glicose, ácidos urônicos e por fucose, glicose e ácidos urônicos, respectivamente.
- ✓ As análises espectroscópicas revelaram bandas características de carboidratos, sendo que as diferentes frações (F50UI, F70UI, F50Fv e F70Fv) apresentaram espectros distintos, revelando o real fracionamento dos polissacarídeos, o que também refletiu em efeitos biológicos diferentes;
- ✓ As frações de *U. lactuca* L. (F50UI) e *F. vesiculosus* L. (F50Fv e F70Fv) apresentaram atividade anticoagulante. Sugere-se que essa atividade esteja relacionada principalmente a inibição de fatores da via intrínseca da coagulação, bem como pela inibição dos fatores IIa e Xa, via antitrombina III;
- ✓ As frações (F50UI, F50Fv e F70Fv) apresentaram efeito antitrombótico *in vivo*, destacando-se F50UI que apresentou atividade antitrombótica *in vivo* importante, com inibição completa da formação de trombos nas concentrações de 5-10 µg/g em 24 horas de ação e efeito tempo dependente na concentração 10 µg/g; Sugere-se que o efeito desta amostra possa ser mediado por integrinas na membrana de células endoteliais, indução da atividade de cálcio calmodulina e ao aumento da produção de NO;
- ✓ Os polissacarídeos da fração F50UI de *U. lactuca* L. aumentaram a produção e ou liberação de mediadores inflamatórios sugerindo que esta fração pode atuar modulando a resposta inflamatória, enquanto as frações de *F. vesiculosus* L. (F50Fv e F70Fv) inibem a produção desses mediadores, sugerindo uma resposta anti-inflamatória.

Por fim, concluiu-se que a partir do processo de extração e fracionamento realizado neste trabalho obteve-se a fração F50UI de *U. lactuca* L. com importantes efeitos anticoagulante, antitrombótico e sobre a resposta inflamatória. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, propõe-se como perspectivas futuras estudos mais aprofundados para melhor definição dos mecanismos de ação das atividades destes polissacarídeos, bem como daqueles relacionados a estrutura-atividade.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ALBUQUERQUE, I. R. L.; CORDEIRO, S. L.; GOMES, D. L.; DREYFUSS, J. L.; FILGUEIRA, L. G. A.; LEITE, E. L.; NADER, H. B.; ROCHA, H. A. O. Evaluation of Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Activities of a Heterofucan from *Dictyota menstrualis*. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2722-2740, 2013.
- ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. In vitro cytotoxicity assessment of ulvan, a polysaccharide extracted from green algae. **Phytotherapy research**, v. 27, p. 1143-1148, 2013.
- AMORIM, R. C. N.; RODRIGUES, J. A. G.; HOLANDA, M. L.; MOURÃO, P. A. S.; BENEVIDES, N. M. B. Anticoagulant properties of a crude sulfated polysaccharide from the red marine alga *Halymenia floresia* (Clemente) C. Agardh. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 3, p. 255-261, 2011.
- ARATA, P. X.; QUINTANA, I.; CANELÓN, D. J.; VERA, B. E.; COMPAGNONE, R. S.; CIANCIA, M. Chemical structure and anticoagulant activity of highly pyruvylated sulfated galactans from tropical green seaweeds of the order Bryopsidales. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 376-386, 2015.
- AREPALLY, G. M.; ORTEL, T. L. Heparin-Induced Thrombocytopenia. **Annual Review of Medicine**, v. 61; p. 77-90, 2010.
- AZEVEDO, T. C. G. de. **Ação dos polissacarídeos sulfatados de *Fucus vesiculosus* na hemostasia e no sistema complemento**. 2006. 124 f. Dissertação. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.
- BARROSO, E. M.; COSTA, L. S.; MEDEIROS, V. P.; CORDEIRO, S. L.; COSTA, M. S.; FRANCO, C. R.; NADER, H. B.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. A non-anticoagulant heterofucan has antithrombotic activity in vivo. **Planta Med**, v. 74, n. 7, p. 712-718, 2008.
- BEINKE, S.; LEY, S. C. Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology. **Biochemical Journal**, v. 382, p. 393-409, 2004.
- BENI, S.; LIMTIACO, J. F. K.; LARIVE, C. K. Analysis and characterization of heparin impurities. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 527-539, 2011.
- BERRY, E.; HERNANDEZ-ANZALDO, S.; GHOMASHCHI, F.; LEHNER, R.; MURAKAMI, M.; GELB, M. H.; KASSIRI, Z.; WANG, X.; FERNANDEZ-PATRON, C. Matrix Metalloproteinase-2 Negatively Regulates Cardiac Secreted Phospholipase A2 to Modulate Inflammation and Fever. **Journal of the American Heart Association**, n. 4, v. 4, p. 1-22, 2015.

BHILOCHA, S.; AMIN, R.; PANDYA, M.; YUAN, H.; TANK, M.; LOBELLO, J.; SHYTUHINA, A.; WANG, W.; WISNIEWSKI, H. G.; DE LA MOTTE, C.; COWMAN, M. K. Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis methods for molecular mass analysis of 5- to 500-kDa hyaluronan. **Analytical Biochemistry**, v. 417, n. 1, p.41-49, 2011.

BIKKER, P.; KRIMPEN, M. M.; WIKSELAAR, P.; HOUWELING-TAN, B.; SCACCIA, N.; HAL, J. W.; HUIJGEN, W. J. J.; CONE, J. W.; LÓPEZ-CONTRERAS, A. M. Biorefinery of the green seaweed *Ulva lactuca* to produce animal feed, chemicals and biofuels. **Journal of Applied Phycology**, p. 1-15, 2016.

BOUÇAS, R. I.; MIRANDA, T. A.; BOUÇAS, T. R. J.; NADER, H. B. Novas drogas antitrombóticas: comparação das atividades anticoagulante, antitrombótica e hemorrágica. **Science in health**, v. 3, n. 2, p. 104-108, 2012.

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

BRADING, J. W. E.; GEORG-PLANT, M. M. T.; HARDY, D. The Polysaccharide from the Alga *Ulva lactuca*. Purification, Hydrolysis, and Methylation of the Polysaccharide. **Royal Holloway college**, n. 4658, p. 319-324, 1954.

BRIAND, X.; MORAND, P. Anaerobic digestion of *Ulva* sp. 1. Relationship between *Ulva* composition and methanisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 511–524, 1997.

BRUHN, A.; DAHL, J.; NIELSEN, H. B.; NIKOLAISEN, L.; RASMUSSEN, M. B.; MARKAGER, S.; OLESEN, B.; ARIAS, C.; JENSEN, P. D. Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2595–2604, 2011.

CAEL, J. J.; KOENIG, J. L.; BLACKWELL, J. Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrate. **Carbohydrate Research**, v. 29, p. 123-134, 1973.

CAIVANO M, COHEN P. Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 164, n.6, p. 3018-25, 2000.

CAMARA, R. B. G.; COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; NOBRE, L. T. D. B.; DANTAS-SANTOS, N.; CORDEIRO, S. L.; COSTA, M. S. S. P.; ALVES, L. G.; ROCHA, H. A. O. Heterofucans from the Brown Seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with Anticoagulant and Antioxidant Activities. **Marine Drugs**, v. 8, 124-138, 2011.

CARDOSO, M. E. **Efeitos de frações obtidas da fucoídiana de *Fucus vesiculosus* em modelo experimental de artrite induzida por zymosan**. 2007. 85 f. Dissertação. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

- CASTRO, L.; WILL, S. E. P.; PINHEIRO, T. S.; CASTRO, A. J. G.; SANTOS, M. S. N.; SORIANO, E. M.; LEITE, E. L. Potential anti-angiogenic, antiproliferative, antioxidant, and anticoagulant activity of anionic polysaccharides, fucans, extracted from brown algae *Lobophora variegata*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 1315–1325, 2015.
- CASU, B.; NAGGI, A.; TORRI, G. Heparin-derived heparan sulfate mimics that modulate inflammation and cancer. **Matrix Biology**, v. 29, n. 6, p. 442-452, 2010.
- CHEN, C.; YANG, F.; ZHANG, Q.; WANG, F.; HU, Y.; XIA, Z. **Natural Products for Antithrombosis**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2015, p. 1-17, 2015.
- CHIU, Y.; CHAN, Y.; LI, T.; WU, C. Inhibition of Japanese Encephalitis Virus Infection by the Sulfated Polysaccharide Extracts from *Ulva lactuca*. **Marine Biotechnology**, v. 14, p. 468-478, 2012.
- CHOAY, J.; PETITOU, M.; LORMEAUI, J.C.; SINAY, P.; CASU, B.; GATT, G. Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 116, n. 2, 1983.
- CHOI J, JUNG HJ, LEE KT, PARK HJ. Antinociceptive and antiinflammatory effects of the saponin and sapogenins obtained from the stem of *Akebia quinata*. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, p. 78–85, 2005.
- COCHRANE, C. G.; REVAK, S. D.; WUEPPER, K. D. Activation of hageman factor in solid and fluid phases: a critical role of kallikrein. **The journal of experimental medicine**, v. 138, p. 1564-1583, 1973.
- COLBURN, P.; BUONASSISI, V. Anti-clotting activity of endothelial cell cultures and heparan sulfate proteoglycans. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 104, n. 1, p. 220-227, 1982.
- COLLEN, D. The plasminogen (fibrinolytic) system. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, p. 259-70, 1999.
- COLMAN, R. W.. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin?. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 3, p. 493–495, 2006.
- CONCHIE, J.; PERCIVAL, E. G. V. Fucoidin. Part II. The hydrolysis of a methylated fucoidin prepared from *Fucus vesiculosus*. **Journal of the American Chemical Society**, p. 827-832, 1950.
- COOKE, J. P.; DZAU, V. J. Nitric oxide synthase: Role in the Genesis of Vascular Disease. **Annual Review of Medicine**, v. 48, p. 489-509, 1997.
- COSTA, C.; ALVES, A.; PINTO, P. R.; SOUSA, R. A.; SILVA, E. A. B. DA; REIS, R. L.; RODRIGUES, A. E. Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 537– 546, 2012.



COSTA, M. S. S. P.; COSTA, L. S.; CORDEIRO, S. L.; LIMA, J. A.; SANTOS, N. D.; MAGALHÃES, K. D.; SABRY, D. A.; ALBUQUERQUE, I. R. L.; PEREIRA, M. R.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Evaluating the possible anticoagulant and antioxidant effects of sulfated polysaccharides from the tropical green alga *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p. 1159–1167, 2012a.

COURA, C. O.; SOUZA, R. B.; RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. DE S. O.; ARAÚJO, I. W. F. DE; RIBEIRO, N. A.; FROTA, A. F.; RIBEIRO, K. A.; CHAVES, H. V.; PEREIRA, K. M. A.; CUNHA, R. M. S. DA; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Mechanisms Involved in the Anti-Inflammatory Action of a Polysulfated Fraction from *Gracilaria cornea* in Rats. **Plos one**, v. 10, n. 3, p.1-18, 2015.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JR., D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CUNHA, A. L.; OLIVEIRA, L. G.; MAIA, L. F.; OLIVEIRA, F. C.; MICHELACCI, Y. M.; AGUIAR, J. A. K. Pharmaceutical grade chondroitin sulfate: Structural analysis and identification of contaminants in different commercial preparations. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, p. 300-308, 2015.

CUSHMAN, M. Epidemiology and Risk Factors for Venous Thrombosis. **Seminars in Hematology**, v. 44, n. 7, p. 62-69, 2007.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p. 1310-1312, 1964.

DEVAKI, T.; SATHIVEL, A.; RAGHAVENDRAN, H. R. B. Stabilization of mitochondrial and microsomal function by polysaccharide of *Ulva lactuca* on D-Galactosamine induced hepatitis in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 177, p. 83–88, 2009.

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

DI FERRANTE, N.; NICHOLS, B. L.; DONELLY, P. V.; NERI, G.; HRGOVIC, R.; BERGLUND, R. K.. Induced degradation of Glycosaminoglycans in hurler's and hunter's syndromes by plasma infusion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 68, n. 2, 303-307, 1971.

DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemical Journal**; v. 78, n. 2, 312-319, 1961.

DORE, C.M.; FAUSTINO, M. G. A. C.; WILL, L. S.; COSTA, T. G.; SABRY, D.A.; SOUZA, L. A. R.; ACCARDO, C. M.; ROCHA H. A.; FILGUEIRA L. G.; LEITE E. L. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 467-475, 2013.

DROZD, N. N.; SHEVCHENKO, N. M.; ERMAKOVA, S. P.; LAPIKOVA, E. S.; MAKAROV, V. A.; ZVYAGINTSEVA, T. N. Effects of the structural characteristics of fucoidans from brown seaweeds on anticoagulant activity and the electrophoretic mobility of complexes with protamine sulfate. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 45, n. 1, p. 56-61, 2011.

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

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

EL-BAKY, H. H. A.; EL-BAZ, F. K.; EL-BAROTY, G. S. Natural preservative ingredient from marine alga *Ulva lactuca* L.. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, p. 1688–1695, 2009.

ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M.; CERESO, A. S. The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroids from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. **Carbohydrate Research**, v. 325, n. 4, p. 287–299, 2000.

FEDOROV, S. N.; ERMAKOVA, S. P.; ZVYAGINTSEVA, T. N.; STONIK, V. A. Anticancer and Cancer Preventive Properties of Marine Polysaccharides: Some Results and Prospects. **Marine Drugs**, v. 11, p. 4876-4901, 2013.

FRANCO R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, v. 34, p. 229-237, 2001.

FREIRE, M. O.; DYKE, T. E. V. Natural resolution of inflammation. **Periodontology**, v. 63, n. 1, p. 149–164. 2013.

FUNAMI, T., HIROE, M.; NODA, S.; ASAI, I.; IKEDA, S.; NISHINARI, K. Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cations. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 617 - 629, 2007.

GEDDINGS, J. E.; MACKMAN, N. Recently Identified Factors that Regulate Hemostasis and Thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 111, n. 4, p. 570-574, 2014.

GREEN, L. C.; WANGER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p.131–136, 1982.

HASSAN, S.; ABD EL-TWAB, S.; HETTA, M.; MAHMOUD, B. Improvement of lipid profile and antioxidant of hypercholesterolemic albino rats by polysaccharides extracted from

the green alga *Ulva lactuca* Linnaeus. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 333–340, 2011.

HWANG, P.; CHIEN, S.; CHAN, Y.; LU, M.; WU, C.; KONG, Z.; WU, C. Inhibition of Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Responses by *Sargassum hemiphyllum* Sulfated Polysaccharide Extract in RAW 264.7 Macrophage Cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, p. 2062-2068, 2011.

IWATA, M.; PILLAI, M.; RAMAKRISHNAN, A.; HACKMAN, R. C.; DEEG, H. J.; OPDENAKKE, G.; TOROK-STORB, B. Reduced expression of inducible gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 in monocytes from patients with myelodysplastic syndrome: correlation of inducible levels with the percentage of cytogenetically marked cells and with marrow cellularity. **Blood**, n. 1, v. 109, p 85-92, 2007.

IROKAWA, M.; NISHINAGA, M.; IKEDA, U.; SHINODA, Y.; SUEMATSU, M.; GOUDA, N.; ISHIMURA, Y.; SHIMADA, K. Endothelial-derived nitric oxide preserves anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 135, p. 9-17, 1997.

JAMES, S. L. Role of Nitric Oxide in Parasitic Infections. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995.

JIAO, L.; LI, X.; LI, T.; JIANG, P.; ZHANG, L.; WU, M.; ZHANG, L. Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*. **International Immunopharmacology**, v.9, p.324–329, 2009.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S.. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. **Marine Drugs**, v. 9, p. 196-223, 2011.

JIANG, H.; TORREGROSSA, A. C.; PARTHASARATHY, D. K.; BRYAN, N. S. Natural Product Nitric Oxide Chemistry: New Activity of Old Medicines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p 1-9, 2012.

JIN, R. C.; LOSCALZO, J. Vascular nitric oxide: formation and function. **Journal of Blood Medicine**, v. 1, p. 147-162, 2010.

KAČURÁKOVÁ, M.; MATHLOUTHI, M. FTIR and laser-Raman spectra of oligosaccharides in water: characterization of the glycosidic bond. **Carbohydrate Research**, n. 284, v. 2, p.145-157, 1996.

KAČURÁKOVÁ, M.; CAPEK, P.; SASINKOVA, V.; WELLNER, N.; EBRINGEROVA, A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 195-203, 2000.

KAEFFER, B.; BENARD, C.; LAHAYE, M.; BLOTTIERE, H. M.; CHERBUT, C. Biological Properties of Ulvan, a New Source of Green Seaweed Sulfated Polysaccharides, on Cultured Normal and Cancerous Colonic Epithelial Cells. **Planta Medica**, v. 65, p. 527-531, 1999.

KANG, S.; KIM, K.; LEE, S.; AHN, G.; CHA, S.; KIM, A.; YANG, X.; KANG, M.; JEON, Y. Anti-inflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of *Ecklonia cava* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 80–85, 2011.

KNUTSEN, S. H.; LYSLABODSK, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I. A modified system of nomenclature for red algae galactans. **Botânica Marina**, v. 37, p. 163-169, 1994.

KVIETYS, P. R.; GRANGER, D. N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, n. 52, v. 3, p. 556–592, 2012.

KWAK, K.; CHO, K.; HAHN, O.; LEE, K.; LEE, B.; KO, J.; CHUNG, K. Biological effects of fucoidan isolated from *Fucus vesiculosus* on thrombosis and vascular cells. **The Korean Journal of Hematology**, v. 45, n. 1, 2010.

LAHAYE, M.; BRUNEL, M.; BONNIN, E. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta). **Carbohydrate Research**, v. 304, p. 325–333, 1997.

LAHAYE, M.; JEGOU, D.; BULEON, A. Chemical characteristics of insoluble glucans from the cell wall of the marine green alga *Ulva lactuca* (L.) Thuret. **Carbohydrate Research**, v. 262, 115–125, 1994.

LAHAYE, M. NMR spectroscopic characterisation of oligosaccharides from two *Ulva rigida* ulvan samples (Ulvales, Chlorophyta) degraded by a lyase. **Carbohydrate Research**, v. 314, p. 1–12, 1998.

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico chemistry. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 173–184, 2001.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1765-1774, 2007.

LAURIENZO, P. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2435-2465, 2010.

LEIRO, J. M.; CASTRO, R.; ARRANZ, J. A.; LAMAS, J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 879–888, 2007.

LI, B.; LU, F.; WEI, X.; Z. R. Fucoidan: Structure and Bioactivity. **Molecule**, v.13, p. 1671-1695, 2008.

LI, H.; MAO, W.; ZHANG, X.; QI, X.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; XU, J.; ZHAO, C.; HOU, Y.; YANG, Y.; LI, N.; WANG, C. Structural characterization of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide isolated from green alga *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 394–400, 2011.

- LI, J.; WANG, S.; YANG, X.; PANG, G.; ZHENG, H.; SHEN, B.; LI, G.; SHI, D.; WANG, J.; FENG, L.; LI, M.; WEI, W.; QIN, W.; XIE, L. Effect of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* on vascular endothelial cell in psychological stress rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 601–608, 2014.
- LI, NA; MAO, W.; YAN, M.; LIU, X.; XIA, Z.; WANG, S.; XIAN, B.; CHEN, C.; ZHANG, L.; CAO, S. Structural characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Codium divaricatum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p.175–182, 2015.
- LIANG, W.; MAO, X.; PENG, X.; TANG, S. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 776–785, 2014.
- LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, p. 317-325, 2011.
- LIM, J. D.; LEE, S. R.; KIM, T.; JANG, S.; KANG, S. C.; KOO, H. J.; SOHN, E.; BAK, J. P.; NAMKOONG, S.; KIM, H. K.; SONG, I. S.; KIM, N.; SOHN, E.; HAN, J.. Fucoidan from *Fucus vesiculosus* Protects against Alcohol-Induced Liver Damage by Modulating Inflammatory Mediators in Mice and HepG2 Cells. **Marine Drugs**, v. 13, p. 1051-1067, 2015.
- LIMA, M.; NADER, H. Unfractionated and low molecular weight heparin. **BMC Proceedings**, v. 8, n. 4, 2014.
- MACFARLANE RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, p. 498-499, 1964.
- MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**, v. 451, p. 914-918, 2008.
- MAGALHAES, K. D.; COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; OLIVEIRA, R. M.; NOBRE, L. T. D. B.; SANTOS, N. D.; CAMARA, R. B. G.; ALBUQUERQUE, I. R. L.; CORDEIRO, S. L.; SABRY, D. A.; COSTA, M. S. S. P.; ALVES, L. G.; ROCHA, H. A. O. Anticoagulant, Antioxidant and Antitumor Activities of Heterofucans from the Seaweed *Dictyopteris delicatula*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p. 3352-3365, 2011.
- MAO, W.; ZANG, X.; LI, Y.; ZHANG, H. Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, p. 9–14, 2006.
- MARGRET, R. J.; KUMARESAN, S.; RAVIKUMAR, S. A preliminary study on the anti-inflammatory activity of methanol extract of *Ulva lactuca* in rat. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, n. 5, p. 899-902, 2009.
- MARINE DRUGS**. Disponível em: <http://www.mdpi.com/journal/marinedrugs>. Acesso em: 30 de julho de 2015.

- MATSUHIRO, B.; ROMÁN, I. O. O.; TORRES, R. Vibrational spectroscopy characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from sea cucumber *Athyonidium chilensis*. **Carbohydrate Polymers**, n. 88, p. 959-965, 2012.
- MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; CARDOSO, M. L.; MONTEIRO, G. R. G.; OLIVEIRA, F. W.; CHAVANTE, S. F.; GUIMARAES, L. A.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L.. Sulfated Galactofucan from *Lobophora variegata*: Anticoagulant and Anti-inflammatory Properties. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 9, p. 1018-1024, 2008.
- MEDEIROS, V. P.; PAREDES-GAMERO, E. J., MONTEIRO, H. P.; ROCHA, H. A.O.; TRINDADE, E. S., NADER, H. B. Heparin-Integrin Interaction in Endothelial Cells: Downstream Signaling and Heparan Sulfate Expression. **Journal Cellular Physiology**, v. 227, p. 2740–2749, 2012.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.
- MELO, K. R. T.; LIMA, J. A.; GOMES, D. L.; SANTOS, D. N.; CAMARA, R. G. B.; ROCHA, H. A. O. Caracterização e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga parda *Dictyopteris justii*. **Holos**, v. 1, n. 28, p. 29-40, 2012.
- MOMI, S.; FALCINELLI, E.; GIANNINI, S.; RUGGERI, L.; CECCHETTI, L.; CORAZZI, T.; LIBERT, C.; GRESELE, P. Loss of matrix metalloproteinase 2 in platelets reduces arterial thrombosis in vivo. **The journal of experimental medicine**, v. 206, n. 11, p. 2365-2379, 2009
- MOURÃO, P. A. S. Perspective on the Use of Sulfated Polysaccharides from Marine Organisms as a Source of New Antithrombotic Drugs. **Marine Drugs**, v. 13, p. 2770-2784, 2015.
- MORRISON, C. J.; BUTLER, G. S.; RODRIGUEZ, D.; OVERALL, C. M. Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy, **Current Opinion in Cell Biology**, v. 5, p. 645–653, 2009.
- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MÜLLER, F.; GAILANI, D.; RENNÉ, T. Factor XI and XII as antithrombotic targets. **Current Opinion in Hematology**, v. 18, n. 5, p. 349-355, 2011.
- NA, Y. S.; KIM, W. J.; KIM, S. M.; PARK, J. K.; LEE, S. M.; KIM, S. O.; SYNITSYA, A.; PARK, Y. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. **International Immunopharmacology**, n. 10, p. 364–370, 2010.
- NACIFE, V. P; SOEIRO, M. D.; GOMES, R. N.; D'AVILA, H.; CASTRO-FARIA, N. H. C.; MEIRELLES, M. N. L. Morphological and biochemical characterization of macrophages activated by carrageenan and lipopolysaccharide in vivo. **Cell Structure and Function**, v. 29, p. 27–34, 2004.

NADER H. B.; BUONASSISI, V.; COLBURN, P.; DIETRICH, C. P.; Heparin stimulates the synthesis modifies the sulfation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 140, p. 305-310, 1989.

NADER, H.B.; PINHAL, M.A.S.; BAÚ, E.C.; CASTRO, R.A.B.; MEDEIROS, G.F.; CHAVANTE, S.F.; LEITE, E.L.; TRINDADE, E.S.; SHINJO, S.K.; ROCHA, H.A.O.; TERSARIOL, I.L.S.; MENDES, A.; DIETRICH, C.P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 34, p. 699-709, 2001.

NADER, H. B.; LOPES, C. C.; ROCHA, H. A.; SANTOS, E. A.; DIETRICH, C. P. Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 9, p. 951-966, 2004.

NAGAREDDY, P. R.; RAJPUT, P. S.; VASUDEVAN, H.; MCCLURE, B.; KUMAR, U.; MACLEOD, K. M.; MCNEILL, J. H. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 improves endothelial function and prevents hypertension in insulin-resistant rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, p. 705–715, 2011.

NAHRENDORF, M.; SWIRSKI, F. K. Neutrophil-macrophage communication in inflammation and atherosclerosis: Neutrophils may license macrophages to respond to cholesterol crystals and drive inflammation that aggravates atherosclerosis. **Immunology**, v. 349, n. 6245, p. 237-238, 2015.

O'NEILL, A.N. Degradative studies on fucoidan. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, p. 5074-5076, 1954.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. <Disponível em:  
[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/). Acesso em: 10 de maio de 2015.

OWENS, A. P.; MACKMAN, N. Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 104, n. 3, p. 432-439, 2010.

PAKOZDI, A.; AMIN, M.; HAAS, C. S.; MARTINEZ, R. J.; HAINES, G. K.; SANTOS, L. L.; MORAND, E. F.; DAVID, J. R.; KOCH, A. E. Macrophage migration inhibitory factor: a mediator of matrix metalloproteinase-2 production in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 4, p. 1-14, 2006.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews**, v. 4, p. 617-629, 2004.

PATANKAR, M. S.; OEHNINGER, S.; BARNETT, T.; WILLIAMS, R. L.; CLARK, G. F. A Revised Structure for Fucoidan May Explain Some of Its Biological Activities. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 29, p. 21770-21776, 1993.

PERCIVAL, E. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. **British Phycological Journal**, v. 14, n. 2, p. 103-117, 1979.

PEREIRA, L.; SOUSA, A.; COELHO, H.; AMADO, A. M. B.; RIBEIRO-CLARO, P. J. A. Use of FTIR, FT-Raman and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, n. 20, p. 223-228, 2003.

PEREIRA, L.; AMADO, A. M.; CRITCHLEY, A. T.; VELDE, F.; RIBEIRO-CLARO, P.J.A. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1903–1909, 2009.

PEREIRA, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Bioprospecting for bioactives from seaweeds: potential, obstacles and alternatives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 894-905, 2012

PETRONE, L.; EASINGWOOD, R.; BARKER, M. F.; MCQUILLAN, A. J. In situ ATR-IR spectroscopic and electron microscopic analyses of settlement secretions of *Undaria pinnatifida* kelp spores. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 8, p. 410–422, 2011.

PIELESZ, A.; BINIAS, W.; PALUCH, J. Mild acid hydrolysis of fucoidan: characterization by electrophoresis and FT-Raman spectroscopy. **Carbohydrate Research**, n. 346, p. 1937-1944, 2011.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Structure versus anticoagulant and antithrombotic actions of marine sulfated polysaccharides. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, v. 921-928, 2012.

POMIN, V. H. How to analyze the anticoagulant and antithrombotic mechanisms of action in fucanome and galactanome?. **Glycoconjugate Journal**, v. 31, p. 89–99, 2014.

QI, X.; MAO, W.; GAO, Y.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; ZHAO, C.; LI, N.; WANG, C.; YAN, M.; LIN, C.; SHAN, J. Chemical characteristic of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide from *Enteromorpha clathrata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1804–1810, 2012.

QI, X.; MAO, W.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; ZHAO, C.; LI, N.; WANG, C. Chemical characteristics and anticoagulant activities of two sulfated polysaccharides from *Enteromorpha linza* (Chlorophyta). **Oceanic and Coastal Sea Research**, v. 12, p. 175-182, 2013.

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

QUEMENER, B., LAHAYE, M., BOBIN-DUBIGEON, C. Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 179–188. 1997.

RAGHAVENDRAN, H. R. B.; SRINIVASAN, P.; REKHA, S. Immunomodulatory activity of fucoidan against aspirin-induced gastric mucosal damage in rats. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 157–163, 2011.



RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Farmacologia. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 804 p.

RAPOSO, M. F. DE J.; MORAIS, A. M. B.; MORAIS, R. M. S. C. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. **Marine Drugs**, v. 13, p. 2967-3028, 2015.

RASCHKE, W.C; BAIRD, S.; RALPH, P.; NAKOINZ, I. Functional macrophage cell lines transformed by *Abelson leukemia virus*. **Cell**, v. 15, n.1, p. 261-267, 1978.

REYERS, I; KUSSONI, L.; DONATI, M. B.; GAGTANO, G. Failure of aspirina at diferent doses to modify experimental thrombosis in rats. **Thrombosis research**, v. 18, p. 669 – 674, 1980.

REZENDE, B. M.; BERNARDES, P. T. T.; RESENDE, C. B.; ARANTES, R. M. E.; SOUZA, D. G.; BRAGA, F. C.; CASTOR, M. G. M.; TEIXEIRA, M. M.; PINHO, V. *Lithothamnion muelleri* Controls Inflammatory Responses, Target Organ Injury and Lethality Associated with Graft-versus-Host Disease in Mice. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2595-2615, 2013.

RIBEIRO, D.D.; LIJFERING, W.M.; BARRETO, S.M.; ROSENDAAL, F.R.; REZENDE, S.M. Epidemiology of recurrent venous thrombosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, p. 1-7, 2012.

ROBIC, A., GAILLARD, C., SASSI, J. F., LERAT, Y., LAHAYE, M. Ultrastructure of ulvan: A polysaccharide from green seaweeds. **Biopolymers**, v. 91, 652–664, 2009.

ROCHA H. A. O.; FARIAS, E. H. C.; BEZERRA, L. C. L. M.; ALBUQUERQUE, I. R. L.; MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; LEITE, E. L.. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante. **Infarma**, v.16, nº 1-2, p. 82-87, 2004

ROCHA, H. A.; MORAES, F. A.; TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R.; TORQUATO, R. J.; VEIGA, S. S.; VALENTE, A. P.; MOURÃO, P. A.; LEITE, E. L.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent?. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 50, p. 41278-41288, 2005.

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

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

RODRIGUES, E. S.; CASTILHO-FERNANDES, A.; COVAS, D. T.; FONTES, A. M. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; MUSSATTO, S. I.; PASTRANA, L.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Chemical composition and antioxidant activity of sulphated polysaccharides extracted from *Fucus vesiculosus* using diferente hydrothermal processes. **Chemical Papers**, v. 68, n. 2, p. 203–209, 2014.

SATHIVEL, A.; RAGHAVENDRAN, H. R. B.; SRINIVASAN, P.; DEVAKI, T. Anti-peroxidative and anti-hyperlipidemic nature of *Ulva lactuca* crude polysaccharide on D-Galactosamine induced hepatitis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3262–3267, 2008.

SAWICKI, G. Intracellular Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 Activity: New Strategies in Treatment and Protection of Heart Subjected to Oxidative Stress. **Hindawi Publishing Corporation Scientifica**, v. 2013, p. 1-12, 2013.

SILVA, M. E.; DIETRICH, C.P. The structure of heparin Characterization of the products formed from heparina be the action of a heparinase and a heparitinase from *Flavobacterium heparinum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p.6841-6, 1975.

SCHMAIER, A. H.; MCCRAE, K. R. The plasma kallikrein–kinin system: its evolution from contact activation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, p. 2323–2329, 2007.

SCHMAIER, A. H. The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 14, p. 28–39, 2016.

SOKOLOVA, E. V.; BYANKINA, A. O.; KALITNIK, A. A.; KIM, Y. H.; BOGDANOVICH L. N.; SOLOV'EVA, T. F.; YERMAK, I. M. Influence of red algal sulfated polysaccharides on blood coagulation and platelets activation in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 104 A, p. 1431-1438, 2014.

SOUZA, L. A. R. DE; DORE, C. M. P.G.; CASTRO, A. J.G.; AZEVEDO, T. C.G. DE; OLIVEIRA, M. T. B. DE; MOURA, M. F. V.; 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**, v. 2, p. 154–162, 2012.

SREERAMKUMAR, V.; ADROVER, J. M.; BALLESTEROS, I.; CUARTERO, M. I.; ROSSAINT J.; BILBAO, I.; NÁCHER, M.; PITAVAL, C.; RADOVANOVIC, I.; FUKUI Y.; MCEVER, R. P.; FILIPPI, M.; LIZASOAIN, I.; CABELLO, J. R.; ZARBOCK, A.; MORO, M. A.; HIDALGO, A. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. **Inflammation**, v. 346, n. 6214, p. 1234-1238, 2014.

SUCHYTA, D. J.; HANDA, H.; MEYERHOFF, M. E. A Nitric Oxide-Releasing Heparin Conjugate for Delivery of a Combined Antiplatelet/Anticoagulant Agent. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, p. 645–650, 2014.

TABARSA, M.; LEE, S.; YOU, S. Structural analysis of immunostimulating sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa*. **Carbohydrate Research**, v. 361, p. 141-147, 2012.

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 63-71, 2004.

TAUBER, S.; PAULSEN, K.; WOLF, S.; SYNWOLDT, P.; PAHL, A.; SCHNEIDER-STOCK, R.; ULLRICH, O. Regulation of MMP-9 by a WIN-Binding Site in the Monocyte-Macrophage System Independent from Cannabinoid Receptors. **Plos one**, n. 7, v. 11, p. 1-19, 2012.

TEIXEIRA, V. L. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas. **Revista Virtual Química**, v. 5, n. 3, p. 343-362, 2013.

TIAN, H.; YIN, X.; ZENG, Q.; ZHU, LI; CHEN, J. Isolation, structure, and surfactant properties of polysaccharides from *Ulva lactuca* L. from South China Sea. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 577-582, 2015.

TOMLINSON, M. L.; GARCIA-MORALES, C.; ABU-ELMAGD, M.; WHEELER, G. N. Three matrix metalloproteinases are required in vivo for macrophage migration during embryonic development. **Mechanisms of Development**, v.125, p. 1059–1070, 2008.

TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature** (Lond.), v. 166, p. 444-445, 1950.

USP – The Pharmacopeia of the United States of America. 17<sup>a</sup> Revisão. Easton: Mack Printing Company, p. 609-611, 1965.

VANNI, D. S.; HORSTMANN, B.; BENJO, A. M.; DAHER, J. L.; KANAAN, S.; SLEIMAN, M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 3, p. 181-189, 2007.

VASCO, P. D., BLACKWELL, J. AND KOENIG, J. L., Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates. Part II: Normal coordinate analysis of  $\alpha$ -D-glicose. **Carbohydrate Research**, v. 23, p. 407-416, 1972.

ZHANG, Z.; TILL, S.; KNAPPE, S.; QUINN, C.; CATARELLO, J.; RAY, G. J., SCHEIFLINGER, F.; SZABO, C. M.; DOCKAL, M. Screening of complex fucoidans from four brown algae species as procoagulant agents. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 677–685, 2015.

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

ZHU, Z.; ZHANG, Q.; CHEN, L.; REN, S.; XU, P.; TANG, Y.; LUO, D. Higher specificity of the activity of low molecular weight fucoidan for thrombin-induced platelet aggregation. **Thrombosis Research**, v. 125, p. 419–426, 2010.

WANG, W.; WANG, S.; GUAN, H. The Antiviral Activities and Mechanisms of Marine Polysaccharides: An Overview. **Marine Drugs**, v. 10, p. 2795-2816, 2012.

WANG, X.; ZHANG, Z.; YAO, Z.; ZHAO, M.; QI, H. Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 225–230, 2013.

WANG, L.; WANG, X.; WU, H.; LIU, R. Overview on Biological Activities and Molecular Characteristics of Sulfated Polysaccharides from Marine Green Algae in Recent Years. **Marine Drugs**, v. 12, p. 4984-5020, 2014.

WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y.. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 13–20, 2012.

WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7293, p. 427, 2008.

WEITZ, J. New anticoagulant strategies. Current status and future potential. **Drugs**, v. 48, n. 4, p. 485-97, 1994.

WU, Y.; DAI, I.; SCHUMUCKLER, N. G.; BAKDASH, N.; YODER, M. C.; OVERALL, C. M.; COLMAN, R. W. Cleaved high molecular weight kininogen inhibits tube formation of endothelial progenitor cells via suppression of matrix metalloproteinase 2. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 8, n. 1, 185-193, 2010

YAICH, H.; GARNA, H.; BESBES, S.; PAQUOT, M.; BLECKER, C.; ATTIA, H. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. **Food Chemistry**, v. 128, p. 895–901, 2011.

YAICH, H.; GARNA, H.; BESBES, S.; PAQUOT, M.; BLECKER, C.; ATTIA, H. Effect of extraction conditions on the yield and purity of ulvan extracted from *Ulva lactuca*. **Food Hydrocolloids**, v. 31, p. 375-382, 2013.

YAICH, H.; GARNA, H.; BESBES, S.; BARTHÉLEMY, J.; PAQUOT, M.; BLECKER, C.; ATTIA, H. Impact of extraction procedures on the chemical, rheological and textural properties of ulvan from *Ulva lactuca* of Tunisia coast. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 53-63, 2014.

YAICH, H.; GARNA, H.; BCHIR, B.; BESBES, S.; PAQUOT, M.; RICHEL, A.; BLECKER, C.; ATTIA, H. Chemical composition and functional properties of dietary fibre extracted by Englyst and Prosky methods from the alga *Ulva lactuca* collected in Tunisia. **Algal Research**, v. 9, p. 65-73, 2015.

YANG, J.; DU, Y.; WEN, Y.; LI, T.; HU, L. Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents. **Carbohydrate Polymers**, n. 52, p. 397–403, 2003.

YANG, J. W.; YOON, S. Y.; OH, S. J.; KIM, S. K.; KANG, K. W. Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 346, p. 345–350, 2006.

## ANEXOS

## ANEXO I



## CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE

Autorização de Funcionamento M.S.1.01284-7  
Aut.Especial de Funcionamento M.S.1.20182-2

Página 19/37  
Impressão 15/07/14 12:18  
NF. 005.270 de 15/07/2014

Insumo: **FUCUS PÓ**

Lote : 24/21 #3  
Lote Fab: 24/21  
Formula : NÃO CONSTA

Origem : França  
Procedencia : Brasil  
PM : N/C  
CAS : N/C

Fabric : 24/03/2014  
Validade : 28/05/2016  
Frac : 620786 10/06/2014  
Analise : 131212 10/06/2014

Ensaio	Especificação	Resultado	Referencia
ASPECTO MACROSCÓPICO	FRAGMENTOS COM CONSISTÊNCIA CÔRNEA, MARROM ESCURO AO ESVERDEADO, ALGUMAS VEZES COBERTARTAS POR ERUPÇÕES ESBRANQUIÇADAS. O TALO CONSISTE EM UMA LÂMINA EM FORMA DE FITA COM VESÍCULAS DE AR OVÓIDES OCASIONAIS.	CONFORME	FABRICANTE
ASPECTO MICROSCÓPICO	EPIDERME COMPOSTA DE CÉLULAS DE PAREDES DELGADAS E VISTAS DE SUPERFÍCIE APRESENTAM CONTORNO POLIGONAL E VISTA DE LADO RETANGULARES. CÔRTEX COM DIVERSAS CAMADAS DE CÉLULAS PARÊNQUIMÁTICAS. OOGÔNICOS ESFÉRICOS E ANTERÍDIOS ESFÉRICOS SÃO OBSERVAOS EM CORTE TRANSVERSAL	CONFORME	FABRICANTE
COR	CASTANHO A CASTANHO ESVERDEADO	CASTANHO ESVERDEADO	FABRICANTE
SABOR	SALGADO, MUCILAGINOSO	SALGADO, MUCILAGINOSO	FABRICANTE
ODOR	MARINHO	MARINHO	FABRICANTE
ELEMENTOS ESTRANHOS	MÁXIMO 2,0%	NÃO ENCONTRADO	FABRICANTE
CINZAS TOTAIS	MÁXIMO: 24,0%	16,45%	FABRICANTE
CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO	MÁXIMO: 3,0%	1,40%	FABRICANTE
DENSIDADE APARENTE	0,600 - 1,00 g/mL	0,724 g/mL	FABRICANTE
UMIDADE	MÁXIMO: 14,0%	3,54%	FABRICANTE
pH	5,0 - 8,0	8,05	FABRICANTE
IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA	IDENTIFICAÇÃO C POSITIVA	POSITIVA	FABRICANTE
GRANULOMETRIA	0,30	0,30	FABRICANTE
DOSEAMENTO	TEOR DE IODINA: MINIMO 0,03%	0,04%	FABRICANTE
METAIS PESADOS	EXPRESSOS EM Pb: MÁXIMO 8,0 ppm	< 1,0 ppm	FABRICANTE
METAIS PESADOS	Pb: MÁXIMO 0,80 ppm	0,00 ppm	FABRICANTE
METAIS PESADOS	Cu: MÁXIMO 30 ppm	0,00 ppm	FABRICANTE
METAIS PESADOS	Sb: MÁXIMO 2,0 ppm	0,01 ppm	FABRICANTE
METAIS PESADOS	As: MÁXIMO 1,0 ppm	0,00 ppm	FABRICANTE
METAIS PESADOS	Hg: MÁXIMO 0,01 ppm	0,01 ppm	FABRICANTE

Continua na Próxima Folha

FC: 109

Dra. Shirlei Conti Teruya de Sales  
Farmacêutica Responsável Técnica  
CRF-SP.65.711

SM EMPREENDIMENTOS FARMACEUTICOS LTDA

Rua Jurupari, 775/779/803  
Cep 04348-070

Jd. Oriental  
São Paulo - SP

Fone 11 5033-3700  
www.fagron.com.br


**CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE**

 Autorização de Funcionamento M.S:1.01284-7  
 Aut.Especial de Funcionamento M.S:1.20182-2

 Página 20/37  
 Impressão 15/07/14 12:18  
 NF. 005.270 de 15/07/2014

 Insumo: **FUCUS PÓ**

Lote : 24/21 #3	Origem : França	Fabric : 24/03/2014
Lote Fab: 24/21	Procedência : Brasil	Validade : 28/05/2016
Formula : NÃO CONSTA	PM : N/C	Frac : 620786 10/06/2014
	CAS : N/C	Análise : 131212 10/06/2014

Ensaio	(Continuação) Especificação	Resultado	Referencia
METAIS PESADOS	Cd: MÁXIMO 1,0 ppm	0,00 ppm	FABRICANTE
MICROBIOLOGIA	CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIA AERÓBIAS: MÁXIMO 10(3) UFC/g OU mL	AUSENTE	FABRICANTE
MICROBIOLOGIA	CONTAGEM BOLORES E LEVEDURAS: MÁXIMO 10 <sup>2</sup> UFC/g OU mL	AUSENTE	FABRICANTE
MICROBIOLOGIA	ESCHERICHIA COLI (COLIFORMES): AUSENTE/g OU mL	AUSENTE	FABRICANTE
MICROBIOLOGIA	STAPHYLOCOCCUS AUREUS: AUSENTE/g OU mL	AUSENTE	FABRICANTE
MICROBIOLOGIA	PSEUDOMONAS AERUGINOSA: AUSENTE/g OU mL	AUSENTE	FABRICANTE
MICROBIOLOGIA	SALMONELLA SP: AUSENTE/10g OU mL	AUSENTE	FABRICANTE
MICROBIOLOGIA	BACTÉRIA GRAM NEGATIVA BILETOLERANTE: MÁXIMO 10 <sup>2</sup> UFC/g OU mL	AUSENTE	FABRICANTE

NOMENCLATURA : FUCUS VESICULOSUS  
 OBSERVAÇÃO : NOME BOTÂNICO: Fucus vesiculosus L.  
 FAMÍLIA: FUCACEAE  
 MÉTODO DE SECAGEM: AO SOL  
 PARTE UTILIZADA: ALGA  
 DESCONTAMINAÇÃO/ MÉTODO: IRRADIAÇÃO GAMA

**Ficha de Segurança**

SEGURANÇA : ARMAZENE-O EM LOCAL SECO E AREJADO, LONGE DO CALOR DIRETO E DA UMIDADE,  
 MANTENDO-O NA EMBALAGEM ORIGINAL.

OBS: (\*) Os ensaios assinalados foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA CNPJ: 44.015.477/0006-20 e os demais ensaios foram transcritos conforme o Certificado de Análise do Fabricante

Dra. Shirlei Conti Teruya de Sales  
 Farmacêutica Responsável Técnica  
 CRF-SP:65.711

**SM EMPREENDIMENTOS FARMACEUTICOS LTDA**

 Rua Jurupari, 775/779/803  
 Cep 04348-070

 Jd. Oriental  
 São Paulo - SP

 Fone 11 5033-3700  
 www.fagron.com.br

## ANEXO II



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 037/2014 – CEUA sobre “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA DE POLISSACARÍDEOS DE ALGA - FRAÇÕES FPS1 E FPS2” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de VALQUÍRIA PEREIRA DE MEDEIROS com a colaboração de JAIR ADRIANO KOPKE DE AGUIAR, CAMILA DE MELO ACCARDO e SAMARA EVANGELISTA REIS, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/12/2014. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 192 ratos da linhagem Wistar (192 machos) de 70 dias de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período de 05/02/2015 a 05/07/2016.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº. 037/2014 - CEUA about “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITROMBÓTICA DE POLISSACARÍDEOS DE ALGA - FRAÇÕES FPS1 E FPS2” under responsibility of VALQUÍRIA PEREIRA DE MEDEIROS and collaboration of JAIR ADRIANO KOPKE DE AGUIAR, CAMILA DE MELO ACCARDO and SAMARA EVANGELISTA REIS - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 02/12/2014. For the development of this research 192 rats of lineage Wistar (192 males) of 70 days old, will be delivered as requested in the period of 05/02/2015 to 05/07/2016.

**Juiz de Fora, 04 de Dezembro de 2014**

  
\_\_\_\_\_  
Coordenadora  
CEUA

  
\_\_\_\_\_  
Vice-coordenadora  
CEUA