



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

JULIANA MARIA COSTA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO RICO EM
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ANGIOSPERMA
MARINHA *Halodule wrightii*.**

**NATAL
2008**

JULIANA MARIA COSTA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO RICO EM
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ANGIOSPERMA
MARINHA *Halodule wrightii*.**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

**NATAL
2008**

Divisão de Serviços Técnicos
Catalogação da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial Leopoldo
Nelson.

Silva, Juliana Maria Costa da.

Caracterização parcial e atividades farmacológicas do extrato rico em polissacarídeos sulfatados da angiosperma marinha *Halodule wrightii* / Juliana Maria Costa da Silva. – Natal (RN), 2008.
85 f.

Orientador: Hugo Alexandre de Oliveira Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

1. Polissacarídeos sulfatados - Dissertação. 2. Galactanas sulfatadas - Dissertação. 3. Atividade anticoagulante - Dissertação. 4. Atividade antioxidante - Dissertação. 5. *Halodule wrightii* – Dissertação. I. Rocha, Hugo Alexandre de Oliveira. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BC

CDU 547.458(043.3)

JULIANA MARIA COSTA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ANGIOSPERMA MARINHA
Halodule wrightii.**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

Aprovado em: 25/11/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha
Departamento de Bioquímica – UFRN
Orientador

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Departamento de Biologia Molecular – UFPR
1º Examinador

Profª. Drª. Fernanda Wanderley de Oliveira
Departamento de Morfologia – UFRN
2º Examinador

Dedico este trabalho

Aos meus pais Dilson Pereira e Maria de Fátima como também aos meus irmãos Ricardo Alexandre e Carlos Henrique por tudo que fizeram e fazem por mim até hoje e sei que se não pode ser da melhor maneira possível, com certeza foi o máximo que cada um, ao seu modo, pode fazer.

Em especial quero agradecer a minha mãe que sempre foi um exemplo de vida pra mim de mulher batalhadora e sonhadora buscando sempre alcançar seus objetivos e ideais. Mulher que me mostrou a importância não apenas de sonhar, mas de realizar estes sonhos sempre me dizendo “tenha paciência, tudo tem o seu tempo”.

À minha avó Margarida Freire e ao meu avô Agenor Laurentino que me deram muito carinho e foram exemplos de coragem e luta que tive a oportunidade de conhecer.

Às demais pessoas de toda a minha família que me acompanharam e me acompanham nas fases de minha vida, sintam-se carinhosamente lembrados.

Dedico este trabalho

Ao meu orientador **Hugo Alexandre de Oliveira Rocha** por ter me aceitado e dado a oportunidade de poder trabalhar no Biopol que é muito mais que um laboratório, posso dizer sim que é uma família. Por muitas vezes ter sido mais do que um orientador e posso dizer de coração que foi como um amigo procurando sempre me entender, apoiando e respeitando minhas decisões. Quero também agradecer aqui pelo conhecimento que adquiri durante este período que participei desta família, podendo assim dizer que foi um grande presente que eu recebi nesta caminhada. Por fim, dedico este trabalho ao meu orientador por ser pra mim **um exemplo** de profissional, de pessoa, **de vida**, sempre incentivando e influenciando a todos não apenas com o seu profissionalismo, mas sim também com o seu jeito de ser (com um belo sorriso), de pensar (não apenas em si) e de viver (**feliz**)!!

“Professor é aquele que limita seus ensinamentos a quatro paredes, com um giz, um quadro negro e uma platéia muda de opiniões. Educador é aquele que cumpre seu papel social, profissional, e que além de tudo, sabe escutar o aluno sempre incentivando-o e preparando-o para a vida lá fora; para o mundo.”

Agradecimentos

A Deus sempre fonte de minha inspiração e paz; motivo que me faz levantar e viver a cada dia, um após o outro, que **sempre** me faz levantar após cada queda, que **sempre** enxuga meu rosto após cada lágrima, me enchendo de muita esperança, que **sempre** ilumina meu caminho e o abençoa com muitas, muitas graças, dentre elas, pessoas que aparecem em nossa vida e que fazem toda a diferença. Certa vez ouvi dizer que Deus **sempre** envia anjos para nos proteger e que ao chegarem aqui na terra eles recebem um nome especial chamado “Amigo”. Meu senhor é muito, muito mais do que meu pai, sendo **sempre** meu grande amigo, meu conselheiro, meu colo **sempre** que preciso (e não são poucas as vezes)
Obrigada!!

“O pouco com Deus é muito e o muito sem Deus é nada”

Agradecimentos

Como são muitas as palavras e pouco o espaço para expressá-las quero aqui neste breve momento agradecer a muitos com palavras sinceras. Portanto quero agradecer:

- Aos professores da minha turma do mestrado em especial a **Selma Jerônimo** que de maneira muito simples sempre foi para nós um exemplo nos incentivando e sempre dizendo “não tem segredo, tudo é suor, apenas isso”;
- Aos professores dos demais laboratórios do departamento dispostos a ajudar de alguma forma para realização deste trabalho tenha sido com o conhecimento ou com o empréstimo de materiais;
- Aos professores da banca de qualificação (**Kátia e Luciana**), aos professores do estágio à docência (**Eliseu, Luciana e Hugo**) que contribuíram de forma muito estimulante passando parte de suas experiências e conhecimentos para minha formação docente, o meu muito obrigada;
- À professora, **Fernanda Wanderley de Oliveira** do nosso departamento por ter aceitado participar da banca de defesa. Quero agradecer também pela recepção e sugestões que enriqueceram meu trabalho e contribuíram para minha aprendizagem;
- Ao professor **Edvaldo da Silva Trindade** da UFPR pela presença, recepção e sugestões que contribuíram para o enriquecimento de meu trabalho e agradecer por ter tido a oportunidade de aprender com seu sincero, simples e nobre gesto de humildade.
- Quero agradecer à professora **Edda Lisboa Leite** que apesar dos poucos momentos e das poucas palavras que trocamos (“tudo passa, tudo passa” e outras), mas que foram pra mim grandes gestos que contribuíram para que eu tivesse forças pra chegar até aqui.
- Aos professores e técnicos de outros departamentos em especial a **Naissandra** (Sandrinha) e **Maria de Lurdes** (Lurdinha) sempre dispostas a ajudar, muito obrigada mesmo;
- Quero agradecer também aos professores da graduação, professores de estágios de iniciação científica e aos demais professores que contribuíram

para minha formação acadêmica como também para minha formação pessoal e moral contribuindo para que eu chegasse até aqui;

- Quero agradecer ao pessoal da secretaria de graduação em especial a **Rogério** e **Celma**, a Dona **Margarita** da pós-graduação, aos técnicos do departamento de Bioquímica (**Eliene**) como também aos secretários da limpeza (**Jonas**) que sempre cumpriram com seu trabalho ajudando no que fosse preciso.
- Aos amigos de minha turma do mestrado em especial a **Pablo** (Pablito) e a **Adriana** (Adri), aos amigos dos demais laboratórios em especial a **Norberto** (Norba), aos amigos da minha turma de graduação em especial a **Jefferson** (Jefinho) e a **Rita** (Ritinha), aos amigos do período de estágios de iniciação científica do DBQ em especial a **Lúcia**, **Hérica Myrna** e **Ane Shirley**. Obrigada por todos os bons momentos e também pelos momentos difíceis que passamos juntos.
- Aos amigos mais chegados e antigos que sempre me acompanharam até agora em especial a **Fabiola** e a **Keila Darline** e aos mais novos amigos em especial **Ingrid** e **Regiana** sempre me escutando e me apoiando em muitos momentos.
- A **Carlos Marinho** uma pessoa muito especial que tem acompanhado-me neste momento de minha caminhada e que de maneira muito especial sempre me acalmou e entendeu minhas atitudes.
- Aos amigos da grande família BIOPOL **Sara** (muito obrigada por tudo Sarinha), a **Sayonara** (Sayo), **Rafael** (Rafa), **Dayanne** (Day), **Jailma** (Jadrilma), **Leonardo** (Leo), **Gabriel** (Gabrixto), **Railson** (Ramilson), **Raniere** (Rany), **Leandro** (Lêlê - chefinho 1), **Nednaldo** (Ned – chefinho vice), **Diego** (grande Pópó - chefinho suplente), **Chyntia** (C.Telles Pleurotus), **Mariana** (Mari) o meu muito obrigada a todos e por todos os momentos que passei neste laboratório que contribuíram para minha formação em todos os sentidos.
- Aos demais amigos que não foram citados aqui se sintam por mim inteiramente agradecidos.
- Por fim o meu muito obrigada a todos que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

Concedei-nos Senhor, Serenidade necessária para aceitar as coisas que não podemos modificar, Coragem para modificar aquelas que podemos e Sabedoria para distinguirmos umas das outras.

Reinhold Niebuhr

RESUMO

Os polissacarídeos sulfatados (PS) são biomoléculas com um grande potencial biotecnológico por apresentarem uma diversidade estrutural e farmacológica muito grande. Poucos são os relatos da existência destes polímeros em vegetais superiores, além disso, ainda não se tem relatos da identificação de atividades antioxidantes e anticoagulantes com PS extraídos destes vegetais. Com o intuito de verificar a presença destes polissacarídeos em angiospermas marinhas conhecidas popularmente como capim do mar, foi coletada a espécie marinha *Halodule wrightii*. As porções vegetativas (folha, caule e raiz) não foram separadas sendo preparado inicialmente um extrato denominado de extrato bruto (EB). Após descontaminação protéica o material obtido foi chamado de extrato de polissacarídeos totais (EPT). A presença destes polissacarídeos foi investigada e confirmada por análises químicas, espectroscopia de infravermelho e eletroforese em gel de agarose sendo denominados de extrato rico em polissacarídeos sulfatados (EPS). A análise histológica da localização dos PS resultou na presença destes polissacarídeos principalmente na epiderme da porção vegetativa raiz. As análises químicas mostraram que os polissacarídeos contêm glicose, galactose, xilose e sulfato na proporção de 1: 0,9: 1: 1 e massa molecular de aproximadamente 11 kDa. Os grupos sulfatos estão provavelmente ligados principalmente em C2 de um monossacarídeo. Testes de atividade antioxidante demonstraram que os PS de *H. wrightii* não apresentaram resultado para o teste de capacidade antioxidante total pelo método CAT. Desta forma foi utilizada a atividade de seqüestro do radical DPPH indicado na literatura por dosar a capacidade antioxidante total que resultou em 41,36%. O seqüestro do íon superóxido também foi realizado e resultou em 32,23% assim como o poder redutor que equivaleu a 50% da atividade da Vit. C. Não houve atividade de seqüestro do radical hidroxila assim como atividade quelante de metal. O teste de atividade anticoagulante (aPTT) mostrou que EPS dobra o tempo de coagulação com 20 µg, que é apenas 2,5 vezes a quantidade da Clexane® (heparina de baixo peso molecular). Para o tempo de protrombina (PT) *H.wrightii* não apresentou atividade. Os dados indicam que EPS possuem um potencial biotecnológico anticoagulante e antioxidante e que futuras análises se fazem necessárias para confirmarem esse potencial.

Palavras-chaves: capim do mar, polissacarídeos sulfatados, atividade antioxidante, atividade anticoagulante, *Halodule wrightii*.

ABSTRACT

Sulfated polysaccharides (PS) are biomolecules with a great biotechnological potential. There are few data about PS from high plants. In addition, pharmacological activities of PS from plants have not been carrying out. The aim of this work was extract PS from the angiosperm *Halodule wrightii* and study their anticoagulant and antioxidant activities. Histological analysis showed the presence of the PS mainly in the roots. A polysaccharide-rich extract was obtained from *H. wrightii* by proteolysis followed by methanol and TCA precipitation. Chemical, infra-red analysis and agarose gel electrophoresis in 1.3 diaminopropane acetate buffer confirmed the presence of sulfated polysaccharides made by glucose, galactose, xylose and sulfate residues in the proportion 1: 0,9: 1: 1. In addition polyacrilamide electrophoresis have shown that extract is mainly compose by 11kDa sulfated polysaccharides. Pharmacological analysis have shown total antioxidant capacity (CAT) that resulted in 15,21 µg for equivalent of ascorbic acid, scavenging activity of the DPPH radical with 41,36 % of scavenging, activity of reducing power with the maximum of 0,290 nm (50 % of vitamin C activity) and scavenging activity superoxide radical (O_2^-) with a maximum of 32,23 %. Chelating activity of metal less than 4% and scavenging activity of the radical hydroxyl (OH^-) less than 2%. Time of activated partial tromboplastin (aPTT) doubling the time of coagulation from 20µg of and protrombin time (PT) was not present. The data indicate that PS from *Halodule wrightii* could be considered for future applications in medicine, food production or cosmetic industry.

Keywords: seagrass, sulfated polysaccharides, anticoagulant drugs, antioxidant drugs, *Halodule wrightii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Região de ligação de alguns glicosaminoglicanos à estrutura protéica	21
Figura 2: Unidades dissacarídicas constituintes dos glicosaminoglicanos sulfatados	22
Figura 3: Cascata de coagulação sanguínea	28
Figura 4: Modelos de inibição da trombina pela AT e HC-II potencializados pela ação da heparina	30
Figura 5: Redução tetravalente do oxigênio molecular	34
Figura 6: Reação de Fenton e de Harber - Weiss	35
Figura 7: Enzimas e seus respectivos cofatores no mecanismo de ação do sistema de defesa antioxidante contra as ERMOS a favor do estado antioxidativo	38
Figura 8: Capim do mar da espécie <i>Halodule wrightii</i>	40
Figura 9: Comportamento eletroforético dos extratos do capim do mar <i>H. wrightii</i>	53
Figura 10: Espectro de infravermelho de EPT com uma região entre 4000-500 cm⁻¹	54
Figura 11: Cromatografia descendente em papel do hidrolisado de EPS	55
Figura 12: Comportamento eletroforético de EB e EPS de <i>H. wrightii</i>	57
Figura 13: Lâminas histológicas das porções vegetativas: raiz, caule e folha de <i>Halodule wrightii</i> em azul de toluidina 0,5 %.	58
Figura 14: Seqüestro do radical DPPH	59
Figura 15: Quelação férrica de EPS	60
Figura 16: Sequestro do radical hidroxila	61
Figura 17: Seqüestro do radical superóxido	62
Figura 18: Análise do poder redutor	63

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Algumas das atividades farmacológicas atribuídas às fucanas de algas	24
Tabela II: Estrutura repetitiva de dissacarídeos de galactanas de diferentes espécies de algas vermelhas	26
Tabela III: Análises químicas do extrato bruto e do extrato de polissacarídeos totais do capim do mar <i>H. wrightii</i>	51
Tabela IV: Relação molar dos açúcares e sulfato presentes no EPS do capim do mar <i>H. wrightii</i>	56
Tabela V: Atividade anticoagulante de EPS e de heparinas	64

LISTA DE ABREVIATURAS

aPTT	Tempo de tromboplastina parcial ativada
AT	Antitrombina
CS	Condroitim sulfato
Cat	Catalase
CETAVLON	Cetiltrimetilamônio brometo
CP	Crú de polissacarídeos
CAT	Capacidade antioxidante total
CL	Clexane®
DS	Dermatam sulfato
DPPH	Radical 2,2-dipenil-1-picrilhidrazil
DHBA	Ácido Diidroxibenzóico
EB	Extrato bruto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPT	Extrato de polissacarídeos totais
EPS	Extrato rico em polissacarídeos sulfatados
ERMOs	Espécies reativas do metabolismo do oxigênio molecular
FT	Fator tecidual
Fator II	Protrombina
Fator IIa	Trombina ativa
FVIIa	Fator VIIa
FX	Fator X
FVII	Fator VII
FXa	Fator Xa
FXII	Fator XII
Fe ⁺⁺	Ferro de valência 2
Fe ⁺⁺⁺	Ferro de valência 3
GSH	Glutaciona reduzida
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GSH-Rd	Glutaciona redutase
GSSG	Glutaciona oxidada
GAGs	Glicosaminoglicanos sulfatados
HS	Heparam sulfato

HSC	Heparam sulfato C
HSD	Heparam sulfato D
Hep	Heparina
HC-II	Cofator II de heparina
HO₂⁻	Radical peroxila
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
Mo VI	Molibdênio de valência 6
Mo V	Molibdênio de valência 5
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
O-2	Oxigênio 2
O-3	Oxigênio 3
O-4	Oxigênio 4
O₂	Oxigênio molecular
OH⁻	Radical hidroxila
O₂⁻	Radical superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
PS	Polissacarídeos sulfatados
PT	Tempo de protrombina
PDA	Tampão 1,3 diaminopropano
QS	Queratam sulfato
-SH	Grupo sulfidril
-SS	Ponte dissulfeto
SOD	Superóxido dismutase
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TCA	Ácido tricloroacético
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
XIL	Xilose
2v	Dois volumes

SUMÁRIO

1. - INTRODUÇÃO

1.1 - Polissacarídeos sulfatados	19
1.1.1 - Polissacarídeos sulfatados em animais	20
1.1.2 - Polissacarídeos sulfatados em macroalgas marinhas	23
1.1.3 - Polissacarídeos sulfatados em vegetais superiores	25
1.2 - Coagulação sanguínea	27
1.2.1 - Polissacarídeos sulfatados anticoagulantes	29
1.3 - Atividade antioxidante	32

2. - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral	39
2.2 - Objetivos específicos	39

3. - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Material biológico	40
3.2. - Reagentes	41
3.2.1 - Padrões	41
3.3 - Aparelhos	42
3.4 – “Delipidação etanólica”	42
3.5 - Obtenção do extrato de polissacarídeos (proteólise)	42
3.6 - Tratamento com TCA (ácido tricloroacético)	43
3.7 - Análises químicas	43
3.7.1 - Dosagem de açúcares totais	43
3.7.2 - Dosagem de sulfato	44
3.7.3 - Dosagem de proteínas	44
3.7.4 - Dosagem de fenólicos totais	44
3.8 - Eletroforese em gel de agarose	44
3.9 - Espectroscopia de infravermelho	45
3.10 - Cromatografia em papel (sistema descendente)	45
3.11 - Eletroforese em gel de poliácridamida	45
3.12 - Caracterização histoquímica	46
3.12.1 - Fixação	46
3.12.2 - Técnicas para emblocamento	46
3.13 - Ensaio de atividade antioxidante	47
3.13.1 - Capacidade antioxidante total (CAT)	47
3.13.2 - Atividade de seqüestro do radical DPPH	47
3.13.3 - Atividade de poder redutor	48
3.13.4 - Atividade de seqüestro do radical hidroxila	48
3.13.5 - Atividade quelante de metal	49
3.13.6 - Atividade de seqüestro do radical superóxido	49
3.14 - Ensaio de atividade anticoagulante	50
3.14.1 - Preparo do plasma humano	50
3.14.2 - Testes de aPTT e PT	50
3.15 - Análises estatísticas	50

4. - RESULTADOS	
4.1- Obtenção do extrato de polissacarídeos sulfatados de <i>Halodule wrightii</i>	51
4.2 - Eletroforese em gel de agarose	52
4.3 - Espectroscopia de infravermelho	53
4.4 - Cromatografia descendente em papel do EPS	54
4.5 - Análises químicas do EPS de <i>Halodule wrightii</i>	56
4.6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida do EPS	56
4.7 - Análises histológicas	57
4.8 - Atividades antioxidantes do EPS	58
4.8.1 - CAT - capacidade antioxidante total	58
4.8.2 - Atividade de seqüestro do radical DPPH	59
4.8.3 - Atividade quelante de metal	60
4.8.4 - Atividade de sequestro do radical hidroxila	61
4.8.5 - Seqüestro do radical superóxido	61
4.8.6 - Poder redutor	62
4.8.7 - Atividades anticoagulantes	63
5. - DISCUSSÃO	65
6. - CONCLUSÕES	71
7. - REFERÊNCIAS	72

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

Os carboidratos ou sacarídeos (do grego sakcharon, açúcar) são as moléculas biológicas mais abundantes do planeta. Quando os carboidratos estão na forma de polímeros eles são conhecidos como polissacarídeos e constituem um dos quatro grupos de macromoléculas que compõem os seres vivos. Até 1960 acreditava-se que eles desempenhavam apenas funções passivas como fontes de energia (p. ex., glicose, amido, glicogênio) e como materiais estruturais (p. ex., celulose) (LEHNIGER et al., 2006), contudo, os carboidratos podem ser encontrados na natureza desempenhando as mais variadas funções quando associados a moléculas orgânicas como: proteínas (peptídeoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas) e lipídeos (lipopolissacarídeos e glicolipídeos) (BUSH; PASTOR; IMBERTY, 1999; ROSEMAN, 2001; IOZZO, 1998; GAHMBERG, TOLVANEN, 1996).

Aproximadamente nos últimos 50 anos, um grupo específico de polissacarídeos vem chamando atenção dos pesquisadores por estarem envolvidos em diversos processos celulares (HAN et al., 2005) e por apresentarem diversas atividades farmacológicas: o grupo dos polissacarídeos sulfatados (TOIDA, et al., 2006; TOIDA; CHAIDEDGUMJORN; LINHARDT, 2003; LEE et al., 2004; ATHUKORALA, et al., 2007; DIETRICH, et al., 1985; NADER, 1979).

Os polissacarídeos sulfatados (PS) como os demais polissacarídeos apresentam polidispersão estrutural devido à diversidade de ligações que seus monossacarídeos podem formar entre si, além da possível presença de ramificações e ligações de substituintes em diferentes posições destes polissacarídeos. Todavia, a ligação dos grupamentos sulfato proporciona uma polidispersão mais acentuada quando comparada a dos polissacarídeos neutros ou carboxilados, pois além dos grupos sulfato poderem variar em quantidade, eles possuem um leque maior de posições em que se ligam aos monossacarídeos (DIETRICH, 1984; BOISSON-VIDAL, et al., 1995; SUGAHARA, KITAGAWA, 2000; HARON-BOUHEDJA, et al., 2000; ALVES, 2000). Os PS não são encontrados em todos os seres vivos, eles ocorrem em todos os representantes do reino animal (MEDEIROS, 2000; BRITO et

al., 2008; MOURA, 2004; SANTOS, 2006), já no reino protista, eles são encontrados nas macroalgas (ROCHA, 1998; 2002; ROCHA, et al., 2001; 2005a; 2005b; XAVIER, 2005; MARQUES, 2007; FARIAS et al., 2008; CARDOSO, 2007; AZEVEDO, 2008; MEDEIROS, 2008) e há um registro de sua presença em bactéria, a cianobactéria *Synechocystis aquatilis* (VOLK et al., 2006). No reino plantae até o momento há registro de apenas 06 espécies que sintetizam polissacarídeos sulfatados: 03 espécies de vegetais marinhos (AQUINO et al., 2005); 03 espécies de vegetais dulcícolas (SANTOS, 2007). Não há registro de polissacarídeos sulfatados em vegetais terrestres, fungos ou vírus.

1.1.1 - POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EM ANIMAIS

O primeiro grupo de polissacarídeos sulfatados estudados foram os PS encontrados nos animais. Nesses seres vivos os principais PS encontrados são os glicosaminoglicanos sulfatados (GAGS). Esses polímeros são polissacarídeos lineares com repetições de unidades dissacarídicas constituídas de um resíduo de açúcar não nitrogenado (ácido idurônico, ácido glucurônico ou galactose) e de um resíduo de hexosamina (glucosamina ou galactosamina). Os GAGS se encontram ligados covalentemente a proteínas, formando um grupo de glicoconjugados complexos denominados de proteoglicanos (DIETRICH, 1984). A Figura 1 mostra uma representação esquemática do tipo de ligação mais comum entre GAGS e proteínas, nesse caso os GAGS encontram-se covalentemente ligados às proteínas através de uma região tetrassacarídica formada por ácido glicurônico-galactosil-galactosil-xilose (GlcUA-Gal-Gal-Xil) (SUGARAH, KITAGAWA, 2000).

A classificação dos GAGS baseia-se principalmente na estrutura química dos polissacarídeos sendo considerados os seguintes fatores: tipo de hexosamina encontrada; açúcar não nitrogenado; tipo de ligação glicosídica; quantidade e posição dos grupamentos sulfato (NADER, 1991; PAVÃO et al., 1995; NADANAKA et al., 1998; NADER et al., 1999).

Dessa maneira, podem-se distinguir os diversos tipos de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGS) em: condroitim sulfato (CS); heparam sulfato (HS), heparina (Hep), dermatam sulfato (DS) e queratam sulfato (QS) (DIETRICH, NADER, STRAUS, 1983; DIETRICH, et al., 1998; 1999) como mostrado na Figura 2 (VOLPI; MACARI, 2006).

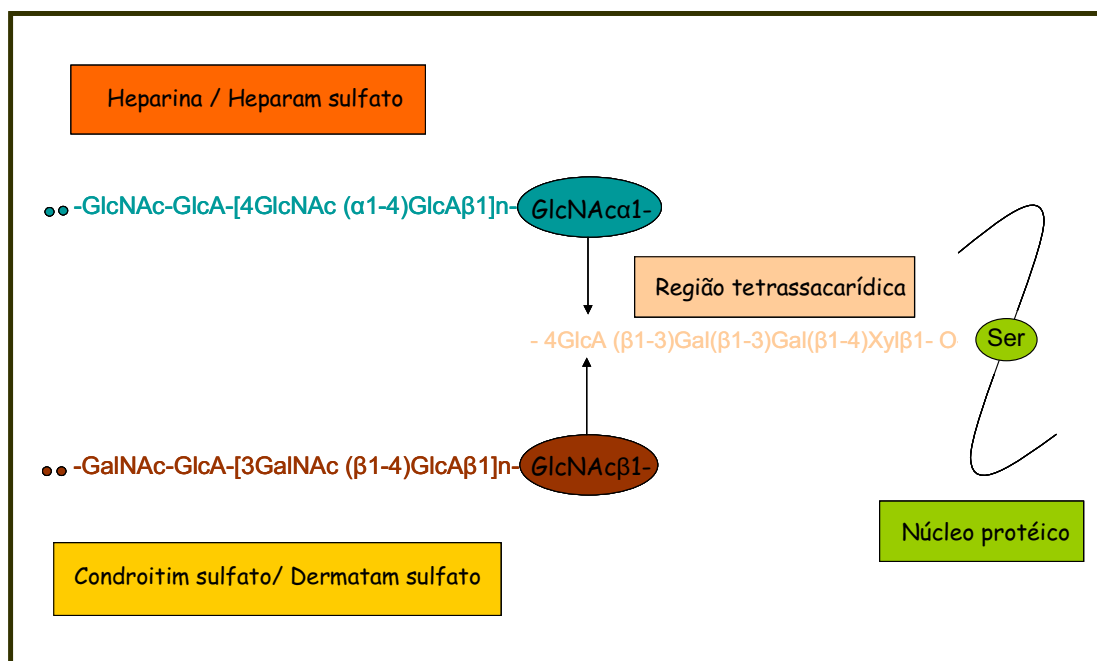


Figura 1 - Região de ligação de alguns glicosaminoglicanos à estrutura protéica. Heparina (Hep), heparan sulfato (HS), condroitim sulfato (CS) e dermatam sulfato (DS) ligam-se ao resíduo de L-serina do núcleo protéico por uma região de ligação comum composta pelo tetrassacarídeo (GlcUA-Gal-Gal-Xil) formando proteoglicanos de CS, DS, HS ou Hep. Modificada de Sugaraha & Kitagawa (2000).

Nessa figura também se encontra o ácido hialurônico único glicosaminoglicano não sulfatado e que não se encontra fazendo parte de proteoglicanos (JACKSON; BUSCH; CARDIN, 1991; OHASHI, et al., 2008), entretanto ele pode ser encontrado associado de forma não covalente a agregans que são proteoglicanos de matriz extracelular encontrados no tecido cartilaginoso, cerebral e nos vasos sanguíneos. Quando associadas, essas biomoléculas formam os agregados de agregans, conferindo suporte mecânico e transporte de solutos nos tecidos em que são encontrados (ESKO, 1991). Além disso, existem outros tipos de proteoglicanos como os da família “leucine-rich”: biglicam, decorim, fibromodulina são encontrados no tecido conjuntivo e estão envolvidos no processo de adesão celular (ESKO, 1991; IOZZO, 1998). Tem-se também o apicam e fosfocam encontrados no cérebro e envolvidos na modulação de interação celular (SHIOI et al., 1992; GRUMET; FRIENDLAND; SAKURAI, 1996).

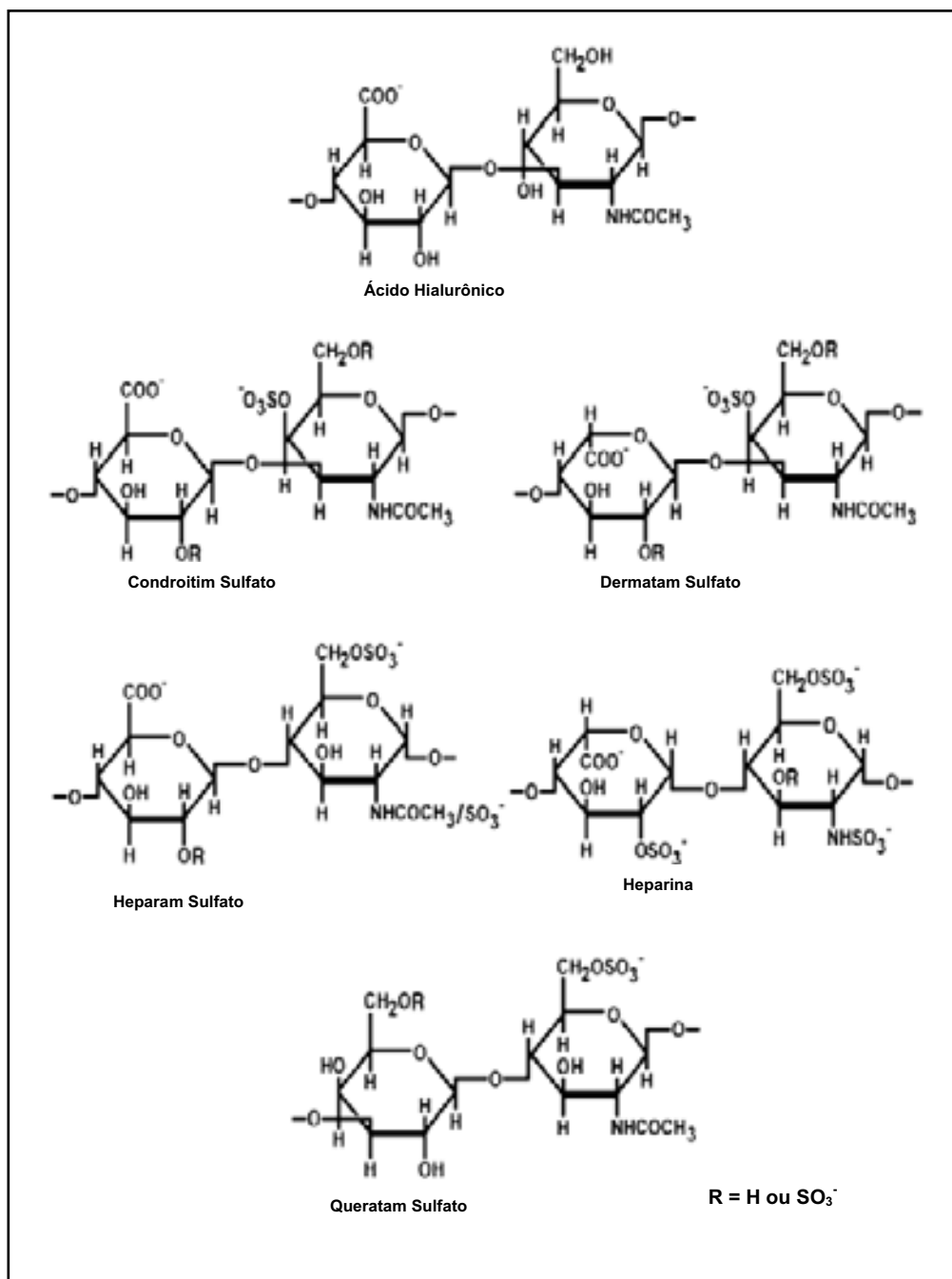


Figura 2 - Unidades dissacarídicas constituintes dos glicosaminoglicanos sulfatados. Ácido hialurônico (ácido glucurônico, N-acetilglucosamina); condroitim sulfato (ácido glucurônico, N-acetilgalactosamina); dermatam sulfato (ácido idurônico, N-acetilgalactosamina); heparam sulfato (ácido glucurônico, N-acetilglucosamina); heparina (ácido idurônico, glucosamina); queratam sulfato (galactose, N-acetilglucosamina). Modificada de Volpi & Macari (2006).

1.1.2 - POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EM MACROALGAS MARINHAS

As algas marinhas são divididas filogeneticamente em três classes: Phaeophyceas ou marrons; Rhodophyceas ou vermelhas; Chlorophyceas ou verdes. Cada classe apresenta sua peculiaridade devido à presença marcante de um grupo específico de PS característico das espécies daquela classe não sendo encontrados em outros seres vivos. Nas algas, estes polissacarídeos sulfatados são encontrados na matriz extracelular e parecem desempenhar função na regulação mecânica, osmótica e iônica desses seres adaptando-os ao meio ambiente (KLOAREG; QUATRANO, 1988; ROCHA, et al., 2006). Estes PS contribuem para a natureza viscosa destes organismos tornando-os flexíveis e maleáveis o bastante para que possam crescer em um ambiente líquido e ao mesmo tempo contribuem também com uma certa rigidez necessária para que as algas permaneçam estendidas aumentando assim sua capacidade de captar a luz e de absorver os nutrientes existentes ao seu redor (PERCIVAL; MACDOWELL, 1967).

Nas algas marrons encontram-se polissacarídeos sulfatados que têm como principal característica a presença do monossacarídeo α -L-fucose sulfatada (ALBUQUERQUE et al., 2004). O termo geral para denominar esses polímeros é fucana. Contudo, quando uma fucana apresenta menos de 90% do resíduo de α -L-fucose sulfatada elas são comumente chamadas de fucoidans ou heterofucanas (ROCHA, et al., 2006). É atribuída às fucanas uma gama de atividades farmacológicas, como mostra a Tabela I. Contudo, são as suas atividades anticoagulante / antitrombótica que são as mais bem caracterizadas (LEITE, et al., 1998; ROCHA, 2002; ROCHA, et al., 2005a; YOON, et al., 2007).

Quanto às Rhodophyceas ou algas vermelhas, elas apresentam as galactanas como grupo característico de polissacarídeos sulfatados encontrados em sua composição, esses polímeros também são conhecidos como carragenanas ou agaranas. As galactanas sulfatadas de algas vermelhas apresentam como unidade fundamental um dissacarídeo de β -galactopiranosose 3-ligada e α -galactopiranosose 4-ligada (LAHAYE, 2001; VAN DE VELDE; PEREIRA; ROLLEMA, 2004). Entretanto, há uma variação estrutural entre os polissacarídeos obtidos de galactanas sulfatadas de diferentes espécies de algas vermelhas coletadas em ambientes diferentes ou em períodos diferentes do ano (SORIANO et al., 2005). Uma parte

substancial ou até mesmo todos os resíduos de α -galactose podem existir como derivados 3,6-anidro.

TABELA I

Algumas das atividades farmacológicas atribuídas às fucanas de algas

Atividade	Alga
Anti-angiogênico	<i>Fucus vesiculosus</i>
Anticomplemento	<i>Laminaria cichorioides</i> , <i>Laminaria japonica</i> , <i>Fucus evanescens</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i>
Anti-migratória	<i>F. vesiculosus</i> , <i>A. nodosum</i>
Antiadesiva	<i>A. nodosum</i> , <i>Laminaria brasiliensis</i> , <i>Spatoglossum schröderi</i> , <i>Sargassum stenophyllum</i>
Anticoagulante	<i>A. nodosum</i> , <i>Ecklonia kurome</i> , <i>Eisenia bicyclis</i>
Antioxidante	<i>F. vesiculosus</i>
Antiproliferativa	<i>A. nodosum</i> , <i>Turbinaria ornata</i>
Antitrombótico	<i>A. nodosum</i>
Anti-neoplásica	<i>A. nodosum</i> , <i>Sargassum thumbergii</i> , <i>Eisenia bicyclis</i>
Anti-úlceras	<i>Cladosiphon okamuranus</i>
Antiviral	<i>Sargassum horneri</i> , <i>F. vesiculosus</i>
Antimetastático	<i>F. vesiculosus</i>
Bloqueio de ligação célula-célula via selectina	<i>F. vesiculosus</i>
Bloqueio de ligação de <i>Helicobacter pylori</i> a células da parede gástrica	<i>Cladosiphon okamuranus</i> , <i>F. vesiculosus</i>
Anticonceptiva	<i>F. vesiculosus</i>
Estímulo da liberação de TNF- α de monócitos	<i>F. vesiculosus</i>
Estímulo de síntese de heparam antitrombótico por células endoteliais	<i>S. schröderi</i>
Fibrinolítica	<i>E. kurome</i> <i>F. vesiculosus</i>
Impedir a rolagem de leucócitos	<i>F. vesiculosus</i>
Modificação da síntese de FN e trombospodina	<i>F. vesiculosus</i>

Fonte : adaptado de ROCHA et al. (2006).

Além disso, os vários grupos hidroxila podem ser substituídos pelo éster de sulfato, metil ou ácido pirúvico (USOV, 1998). Dessa forma estes polímeros se diferenciam pela presença ou ausência destes resíduos (3,6-anidro- α -L-galactose) como também pela presença, quantidade e posição de grupamentos sulfato, metil e/ou ácido pirúvico evidenciando-se estruturas altamente heterogêneas. A Tabela II mostra 15 das estruturas (unidades dissacarídicas repetitivas) já identificadas. Estas estruturas contribuem com a natureza complexa das galactanas sulfatadas destas algas. Sabendo-se que aos polissacarídeos sulfatados é atribuída uma gama de atividades farmacológicas, às carragenanas atribui-se principalmente atividade antiinflamatória (SILVA, 2005).

Já as algas verdes ou Chlorophyceas não apresentam um grupo específico de polissacarídeos que lhe são característicos. Os polissacarídeos sulfatados dessas algas apresentam-se heterogêneos, ricos em galactose, manose, xilose, glicose, arabinose e/ou ácidos urônicos, porém, homopolissacarídeos como xilanas e galactanas também podem ser encontrados (MATSUBARA, et al., 2001; FARIAS, et al., 2008)

A importância farmacológica destes polissacarídeos sulfatados de algas verdes foi evidenciada por se ter verificado as atividades antiviral, antitrombótica e anticoagulante destes compostos (MATSUBARA, et al., 2000; FARIAS, 2006). Segundo Lee et al., 2004, extratos ricos em polissacarídeos encontrados nas algas verdes *Caulerpa brachypus*, *C. Okamurai*, *C. Scapelliformis*, *Codium adhaerens*, *C. Fragille* e *C. Latum* se mostraram como potenciais compostos antiherpéticos, os quais, não só agem no começo da infecção, como também em estágios mais tardios do ciclo viral (MATSUBARA, 2004).

1.1.3 - POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EM VEGETAIS SUPERIORES

No reino plantae, havia apenas um relato da existência de polissacarídeos sulfatados em plantas publicado por Aquino e colaboradores em 2005. Neste trabalho demonstrou-se a presença de tais moléculas em três espécies de angiospermas marinhas: *Ruppia maritima*, *Halodule wrightii* e *Halophila decipiens*. O polissacarídeo de *R. maritima* foi mais bem caracterizado. Esse se mostrou como uma D-galactana sulfatada composta por uma estrutura regular tetrassacarídica: [3-

β -D-Gal-2(OSO₃)-1→4- α -D-Gal-1→4- α -D-Gal-1→3- β -D-Gal-4(OSO₃)-1→]. Esses polímeros estão localizados na parede celular, principalmente do rizoma e raízes, o que indica que suas funções estão relacionadas com a absorção de nutrientes. Além disso, acredita-se que esses PS também estariam relacionados à função estrutural (mecânica) de proteger o vegetal contra o impacto de ondas já que esses vegetais são bastante encontrados em áreas costeiras (AQUINO, et al., 2005).

TABELA II
Estrutura repetitiva de dissacarídeos de galactanas de diferentes espécies de algas vermelhas

Família	Símbolo grego	1,3-ligado	1,4-ligado
kappa	Kappa (κ)	β -D-galactose 4-sulfato	3,6-anidro- α -D-galactose
	Iota (ι)	β -D-galactose 4-sulfato	3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato
	Mu (μ)	β -D-galactose 4-sulfato	α -D-galactose 6-sulfato
	Nu (ν)	β -D-galactose 4-sulfato	α -D-galactose 2,6-di-sulfato
	Omicron (\omicron)	β -D-galactose 4-sulfato	α -D-galactose 2-sulfato
Beta	Beta (β)	β -D-galactose	3,6-anidro- α -D-galactose
	Gama (γ)	β -D-galactose	α -D-galactose 6-sulfato
	Omega (ω)	β -D-galactose 6-sulfato	3,6-anidro- α -D-galactose
	Psi (ψ)	β -D-galactose 6-sulfato	α -D-galactose 6-sulfato
Lambda	Delta (δ)	β -D-galactose	α -D-galactose 2,6-di-sulfato
	Alfa (α)	β -D-galactose	3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato
	Lambda (λ)	β -D-galactose 2-sulfato	α -D-galactose 2,6-di-sulfato
	Theta (θ)	β -D-galactose 2-sulfato	3,6-anidro- α -D-galactose 2-sulfato
	Xi (ξ)	β -D-galactose 2-sulfato	α -D-galactose 2-sulfato
	Pi (π)	β -D-galactose P,2-sulfato	α -D-galactose 2-sulfato

Fonte: adaptado de Lahaye (2001), P: piruvato.

Mais recentemente estudos de nosso laboratório indicaram a presença de polissacarídeos sulfatados em porções vegetativas (raiz, caule, rizoma e folha) das macrófitas aquáticas: *Eichhornia crasips*, *Eleocharis.interstincta* e *Salvinia ariculata* (SANTOS, 2007). *E. interstincta* apresentou maior quantidade de PS na raiz, enquanto que *S. auriculata*, teve as folhas como aquela parte mais enriquecida em PS e *E. crassipes* apresentou o pecíolo como o mais representativo em PS. Além disso, em todos os vegetais estudados a galactose se mostrou como o principal constituinte, sugerindo-se a presença de galactanas sulfatadas nestes vegetais.

Maiores estudos são necessários para uma melhor caracterização destes polissacarídeos sulfatados em vegetais superiores.

1.2 - COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Nas últimas décadas, a atividade anticoagulante dos PS vem chamando a atenção dos pesquisadores na busca do conhecimento mais amplo do sistema de coagulação sanguínea e como estes PS atuam neste sistema.

O mecanismo de coagulação propriamente dito implica numa série complexa de reações interrelacionadas. Macfarlane; Davie & Ratnoff (1964) propuseram a hipótese da cascata para explicar a fisiologia da coagulação do sangue. Esta hipótese foi denominada de modelo clássico do mecanismo de coagulação. Este modelo divide o mecanismo em três vias: a extrínseca, onde há a necessidade de um elemento externo ao sangue (Fator Tecidual) e elementos presentes no sangue circulante, a via intrínseca que envolve somente componentes que estão presentes no meio intravascular e a via comum, a qual se encontra na intersecção das duas vias culminando no fator II (protrombina) que se transforma no fator IIa (trombina ativada) como vista na Figura 3.

A via extrínseca é desencadeada pela formação do complexo Fator Tecidual (FT): Fator VIIa (FVIIa) que ativa o Fator X (FX). O Fator Tecidual (FT) é uma molécula transmembrana de células localizadas fora dos vasos sanguíneos e é uma das principais moléculas responsáveis pela fase inicial da via extrínseca da cascata de coagulação. O Fator Tecidual é exposto na luz do vaso logo após uma injúria vascular e possui uma alta afinidade com o Fator VII (FVII) que favorece a formação do complexo para ativação do FX.

A via intrínseca envolve somente componentes que estão presentes no meio intravascular. Ela é iniciada pela ativação do Fator XII (FXII) quando este entra em contato com o sangue e/ou qualquer superfície contendo cargas negativas, o que desencadeia uma série de ativação protéica ativando diretamente o FX, que ativa a via comum (II-IIa) ativando a trombina transformando o fibrinogênio em fibrina (HOFFMAN, et al., 1995; SAULS; WOLBERG; HOFFMAN, 2003; CHEM, et al., 2008). Não há distinção clara entre os sistemas intrínseco e extrínseco, que atuam de modo altamente interativo *in vivo*. Apesar do conceito das vias intrínseca e

extrínseca terem servido durante anos para explicar a cascata de coagulação as vias não existem em separado estando totalmente interconectadas (BOUÇAS, et al., 2006).

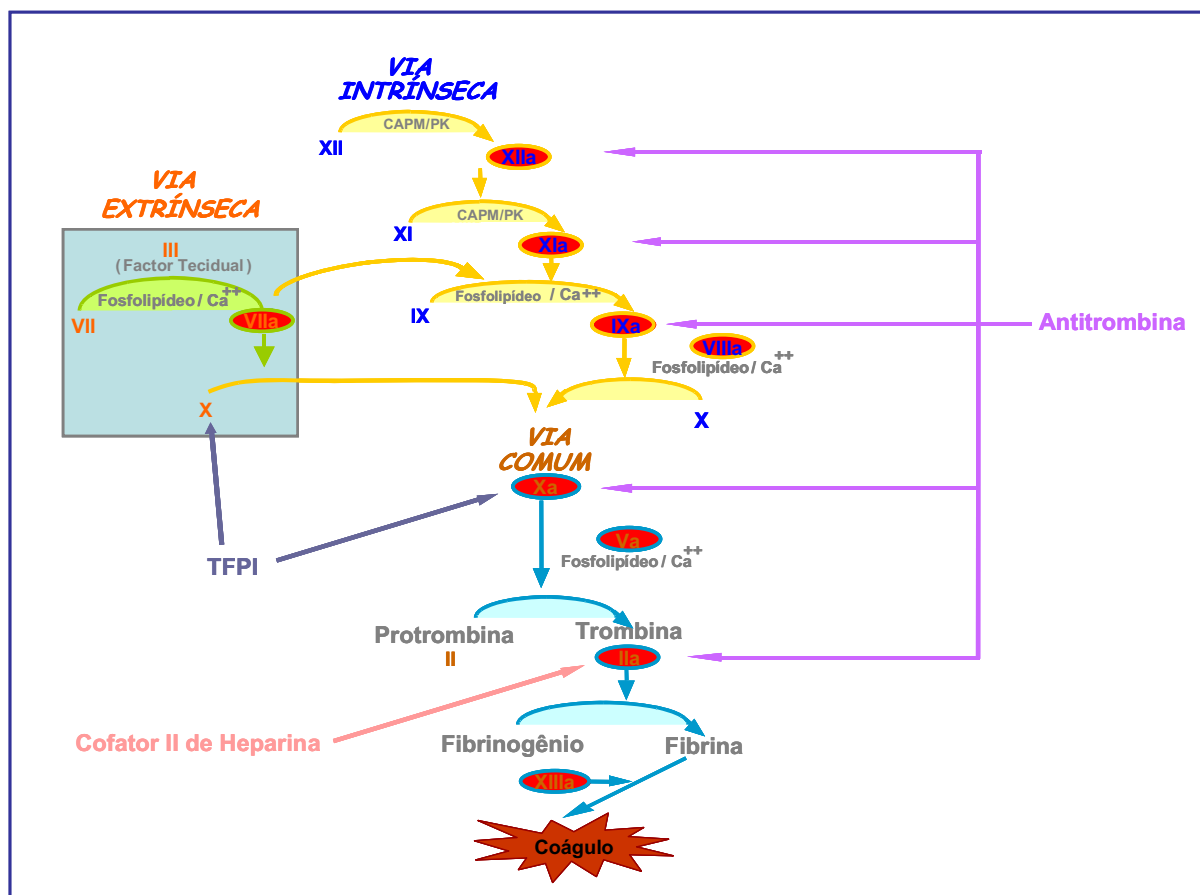


Figura 3 - Cascata de coagulação sanguínea. Vias: extrínseca, intrínseca e comum. Anticoagulantes naturais: antitrombina (AT), cofator II de heparina (HC-II) e inibidor da via do fator tecidual (TFPI). CAPM: cininogênio de alto peso molecular. PK: pré-caliceína.

Em condições fisiológicas, existe a produção equilibrada de quantidades apropriadas de trombina e do coágulo de fibrina, em resposta adequada e proporcional à injúria vascular existente. No estado fisiológico não há formação e deposição de fibrina no meio intravascular, em decorrência de propriedades anticoagulantes do endotélio, de formas inativas das proteínas plasmáticas, e da presença de inibidores fisiológicos da coagulação. Por outro lado, a perda do equilíbrio dinâmico das reações da coagulação tem como consequência clínica, o aparecimento de distúrbios hemorrágicos ou trombóticos (FRANCO, 2001).

1.2.1 - POLISSACARÍDEOS SULFATADOS ANTICOAGULANTES

Tece-se aqui comentários sobre a heparina, principal PS anticoagulante e sobre PS de algas marinhas, estes últimos por estarem mais próximos filogeneticamente aos PS de vegetais, objetos de estudo desse trabalho.

A heparina é um agente anticoagulante terapêutico importante para a profilaxia e o tratamento de trombose (KAKKAR, 1989), sendo o primeiro composto utilizado como agente anticoagulante e antitrombótico. Este polissacarídeo sulfatado age acelerando os efeitos de anticoagulantes naturais encontrados no sangue: co-factor II de heparina (HC-II) e antitrombina (AT) como representado na Figura 4. A interação da heparina com esses compostos acelera seus efeitos inibitórios frente a vários fatores da coagulação como visto na Figura 3 (BÉGUIN; LINDHOUT; HEMKER, 1988). Nem todas as heparinas são capazes de interagir com a AT, mas aquelas que o fazem são as mais potentes. De forma geral a heparina é capaz de interagir com AT e com a trombina ao mesmo tempo, criando um complexo ternário e aproximando essas duas moléculas espacialmente, fazendo com que a AT iniba a trombina. A capacidade de uma heparina interagir com a antitrombina e potencializar seu efeito é dada por uma seqüência pentassacarídica encontrada na estrutura da heparina e por sua massa molecular. São necessários mais de 18 unidades monossacarídicas para formação do complexo ternário heparina-antitrombina-trombina potencializando a ação do anticoagulante natural AT sobre a cascata de coagulação sanguínea (NADER, et al., 2004).

Entretanto, a heparina apresenta alguns pontos negativos com relação ao seu uso. Ela possui efeitos adversos como hemorragia e trombocitopenia além de osteoporose e trombose com seu uso prolongado. Este polissacarídeo é purificado de bovinos e suínos o que dificulta o seu uso por questões religiosas: produtos de origem suína não são aceitos por judeus e muçumanos; produtos de origem bovina não são aceitos por hindus. Apesar de ainda não se ter comprovado, há sempre a possibilidade de contaminação de pacientes por príons, que causariam o mau da vaca louca (DOCTOR, et al., 1991; HIRSH, et al., 1994; BEIJERING, et al., 1996).

Desta forma torna-se necessário o estudo e descoberta de outras fontes de PS que viriam a substituir a heparina. Nas últimas décadas PS extraídos de macroalgas marinhas têm sido bastante estudados sendo suas atividades

anticoagulante e antitrombótica as que chamam mais atenção (ROCHA, 2002; ROCHA, et al., 2005a; 2005b; 2006; MEDEIROS et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2004; FARIAS et al., 2008; SILVA et al., 2005; AZEVEDO et al., 2008; SOUZA et al., 2007; LEITE et al., 1998).

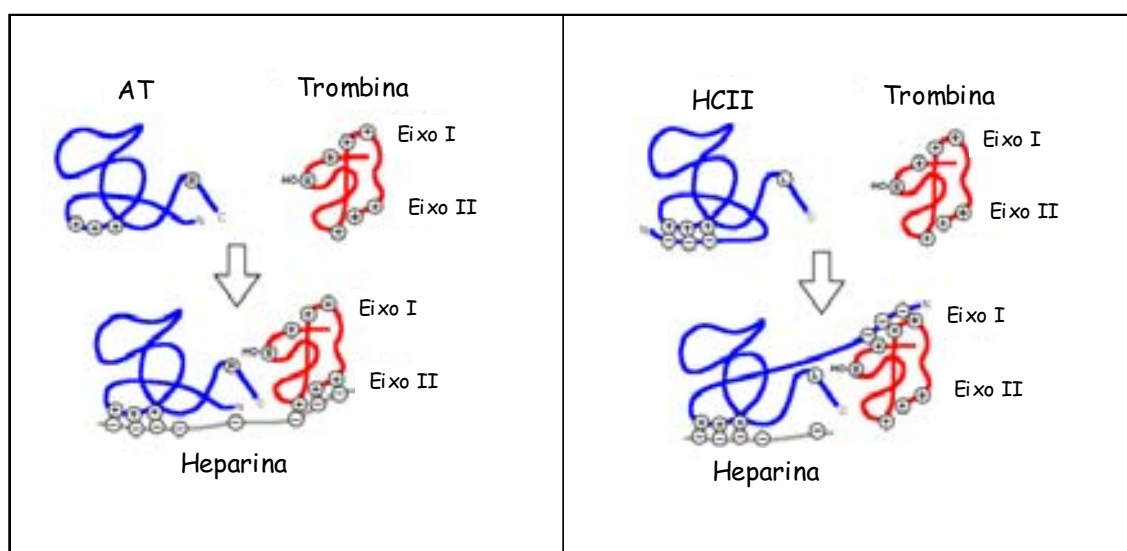


Figura 4 - Modelos de inibição da trombina pela AT e HC-II potencializados pela ação da heparina.

Dados na literatura indicam que vários estudos têm sido realizados para se determinar os requerimentos estruturais para a atividade anticoagulante de galatanas sulfatadas de algas vermelhas (MOURÃO, 2007). Comparações com galactanas de invertebrados e da alga marinha *Botryocladia occidentalis* (λ -carragenana) demonstraram que galactanas compostas por um terço de resíduos de galactose 2,3-dissulfatada possuem atividade semelhante a heparina, enquanto que aquelas que possuem galactoses sulfatadas na posição 2 ou 3 possuem fraca atividade (MELO, et al., 2004). Num estudo subsequente foi observado que galactanas da alga *Gelidium crinale* (15% de suas galactanas são 2,3-dissulfatadas e 55% são 2-sulfatadas) apresentaram baixa atividade em relação a galactana de *B. occidentalis*. Contudo, não houve diferença quando se comparou a capacidade dessas duas galactanas em promover a inibição da trombina na presença da AT, mas quando o HC-II foi usado a galactana de *G. crinale* teve uma atividade muito fraca (PEREIRA, et al., 2005). A comparação entre esses dois polímeros revelou que galactose 2,3-dissulfatada é um requerimento importante para haver a interação

de galactanas sulfatas com inibidores da coagulação. Além disso, parece haver uma proporção ótima dessa unidade monossacarídica para que a galactana possa interagir com o inibidor de coagulação e a protease da cascata de coagulação (PEREIRA, et al., 2005).

A forte atividade anticoagulante da fucana da alga *Fucus vesiculosus* já foi demonstrada na década de 50 (SPRINGER, et al., 1957). Posteriormente demonstrou-se que ela exerce sua atividade por potencializar principalmente o HC-II (DURIG, et al., 1997). Este polímero se liga à região N-terminal do HC-II e forma um complexo ternário com o HC-II e o FXa (COLWELL; GRUPE; TOLLEFSEN, 1999). Por outro lado, fucana de *Fucus evanescens* se liga a AT e apresenta atividade anticoagulante semelhante a heparina (KUZNETSOVA et al., 2003), enquanto que fucanas de *Eklonia kurome* (NISHINO, et al., 1999), *Pelvetia caniculata* (COLLIEC, et al., 1991) e *Ascophyllum nodosum* (MILLET, et al., 1999) possuem atividade anticoagulante por potencializar tanto HC-II como AT. Fucoidans da alga *Lobophora variegata* apresentaram atividade anticoagulante semelhante a da heparina agindo na via intrínseca da coagulação (MEDEIROS, et al., 2008).

A relação estrutura-atividade anticoagulante de fucanas ainda não foi bem definida. A massa molecular tem uma importância nesse efeito. Fucanas com massas abaixo de 50 kDa apresentam melhor atividade anticoagulante (NISHINO, et al., 1991; DURIG, et al., 1997). Contudo, está mais evidente que requerimentos estruturais, como posição dos grupos sulfato, são mais importantes para a atividade anticoagulante de fucanas.

Análises estruturais de oligo-fucanas de *Ascophyllum nodosum* mostraram que sulfatos na posição O-2 de todos os resíduos e em O-3 de alguns resíduos de fucose são obrigatórios para a atividade anticoagulante, enquanto que sulfato em O-4 não é necessário para essa atividade. Além disso, resíduos de fucose 3- e/ou 4- ligados tem que estar presentes (CHEVOLOT, et al., 1999). Sulfatação na posição 3 também se mostrou importante para atividade anticoagulante da fucana da alga *Padina gymnospora* (SILVA, et al., 2005).

Fucanas de *Ascophyllum nodosum* e *Fucus vesiculosus* apresentam outros sítios de ação anticoagulante, além de HC-II e AT, elas inibem a agregação plaquetária melhor do que a heparina (TRENTO, et al., 2001), como também são

capazes de estimular a liberação do TFPI (inibidor da via do fator tecidual) (GIRAUX, et al., 1998).

Fucanas da alga *Spatoglossum schroederi* apresentam atividade antitrombótica *in vivo* sem apresentar atividade anticoagulante *in vitro*. Atribui-se a capacidade dessas fucanas em estimular a síntese de um proteoglicano de heparam sulfato antitrombótico por células endoteliais como o principal mecanismo de ação dessas fucanas (ROCHA, 2002; ROCHA, et al., 2005a; BARROSO, et al., 2008).

Estudos com polissacarídeos de algas verdes têm demonstrado que seu mecanismo de ação está centrado na potencialização do HC-II. Além disso, polissacarídeos ricos em arabinose são mais potentes que aqueles ricos em galactose (HAYAKAWA, et al., 2000).

Contudo, tem sido atribuída como mecanismo de ação anticoagulante de algumas heteroglucanas (MATSUBARA, et al., 2000) e heterogalctanas sulfatadas a capacidade dessas inibirem diretamente a trombina (MATSUBARA, et al., 2001).

Polissacarídeos de Monostromaceae, uma família de algas verdes, mostram-se com potente atividade anticoagulante e antitrombótica. Hayakawa et al. (2000) encontraram dois polissacarídeos sulfatados diferentes em *M. nitidum* e em *M. latissimum* que tiveram efeitos mais potentes na inibição da trombina do que a heparina ou o dermatam sulfato. Polissacarídeos sulfatados extraídos de *Monostroma nitidum* possuem atividade antitrombótica 6 vezes maior do que a heparina, sendo homopolissacarídeos constituídos principalmente de ramnose 1,3 ligada, alguns resíduos de ramnose 1,2 ligadas e os grupamentos sulfato encontram-se na posição O-2 (MAEDA, 1991; HARADA; MAEDA, 1998).

De maneira similar estudos estruturais do polissacarídeo de *M. latissimum* indicaram que ele é constituído principalmente de ramnose 3- e 2-ligadas numa relação de 3:2 e o sulfato estava principalmente no O-3 ou na posição O-4 de resíduos de ramnose 2-ligados (LEE, et al., 1998).

1.3 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Apesar de a atividade anticoagulante dos PS ser uma das atividades mais bem caracterizadas, nada impede o estudo e conhecimento mais amplo quanto a outras atividades; dentre elas, a atividade antioxidante que vem chamando bastante atenção dos pesquisadores e será mais bem detalhada.

Todos os organismos vivos aeróbicos são dotados de um sistema oxidante-antioxidante que precisa estar em constante equilíbrio a favor do estado antioxidativo mantendo a integridade das biomoléculas destes organismos (AZZI; DAVIES; KELLY, 2004; HALLIWELL; GUTEMBERG, 2006).

As espécies reativas que podem conduzir a este desequilíbrio são denominadas de “radicais livres”. Radical livre é qualquer espécie capaz de existir independentemente e que contém um ou mais elétrons não pareados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Quando estes radicais são originados a partir do metabolismo aeróbico do O_2 eles são denominados de “espécies reativas do metabolismo do oxigênio molecular” (ERMOs). Estas espécies reativas estão em todos os sistemas biológicos aeróbicos (HALLIWELL, 2006a). Estes agentes podem ser gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O_2 nas mitocôndrias como também em situações não-fisiológicas por fatores e agentes exógenos, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta do O_2 (ROSS; MOLDEUS, 1991). O oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, aceitando um elétron de cada vez, o que resulta na redução completa desta molécula com a entrada de quatro elétrons, originando diferentes espécies reativas do oxigênio molecular até a formação da água (Figura 5). As principais ERMOs originadas neste processo são: radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Outros estudos confirmam a ação catalítica de metais em reações que levam a formação de ERMOs a partir de metabólitos gerados na redução incompleta do O_2 . As reações de Fenton e de Haber-Weiss *in vitro* confirmam o papel dos metais na formação das ERMOs (Figura 6). Embora, o cobre possa também catalisar a reação de Haber-Weiss, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 2006a).

O radical superóxido ocorre com a primeira redução do O_2 em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 2007a). Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária em sistemas geradores

deste radical como a capacidade de gerar alguns produtos que possuem forte atividade antimicrobiana, tais como ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito (ONOO⁻) sendo os principais responsáveis pelo combate a corpos estranhos (NUNES; OLIVEIRA; MORAIS, 2006)

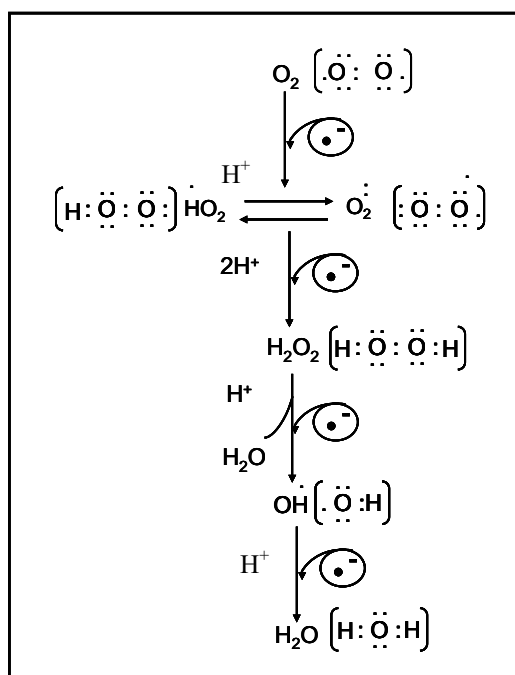


Figura 5 – Redução tetraivalente do oxigênio molecular. Várias espécies reativas são formadas a partir da redução tetraivalente do oxigênio molecular (O₂) resultando na formação da água (H₂O). A partir do O₂ ocorre a entrada do primeiro elétron dando origem ao radical superóxido (O₂⁻) que fica em constante deslocamento com o radical hidroperoxila (HO₂⁻). A entrada do segundo elétron a partir do O₂⁻ juntamente com prótons de hidrogênio (2H⁺) dão origem ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A entrada do terceiro elétron a partir do H₂O₂ origina o radical hidroxila (OH⁻) e uma molécula de H₂O pela entrada do H⁺. Por fim a entrada do quarto e último elétron a partir do OH⁻ resulta na molécula de H₂O. Modificada de Cohen (1989).

O radical hidroxila (OH⁻) é considerado a ERMO mais reativa nos sistemas biológicos. Sua capacidade altamente reativa se deve ao fato desses radicais reagirem com proteínas tornando-as inativas à medida que oxida seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS), com membranas lipídicas causando a peroxidação lipídica e desestabilizando estas membranas, contribuindo para perda da seletividade celular, ou, com o DNA acarretando modificações de bases pirimidínicas e púricas deste DNA levando-o a mutações e / ou surgimento de câncer (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986; HALLIWELL, 2002a; MOORE; YIN; YU, 2006).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado durante a redução incompleta do O_2 não é considerado um radical livre verdadeiro pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada. Entretanto esta ERMO tem vida longa sendo capaz de atravessar membranas e reagir internamente com proteínas ligadas ao Fe^{++} transformando-o em Fe^{+++} e inativando essas proteínas, além disso, são formados radicais hidroxila (OH^\cdot) a partir da Reação de Fenton como mostrado na Figura 6 (EATON, 1991; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 2007a). Os danos causados pelas ERMOs que atingem uma larga escala de biomoléculas essenciais, estão associados a processos como câncer, a doenças coronárias, problemas de saúde relacionados à idade avançada (CADENAS; DAVIES, 2000; UCHIDA, 2000; HALLIWELL, 2007b), apoptose, diabetes mellitus, arteriosclerose, artrite reumatóide e doença de Alzheimer (VEENA, et al., 2006; FINKEL; HOLBROOK, 2000; ZHU, et al., 2004; HALLIWELL, 2006b).

Para as células se protegerem, contra estes danos oxidativos os organismos lançam mão de um sistema de defesa antioxidante que pode atuar em duas linhas. Uma linha atua como detoxificadora do agente antes que ele cause a lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (Cat), glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E.

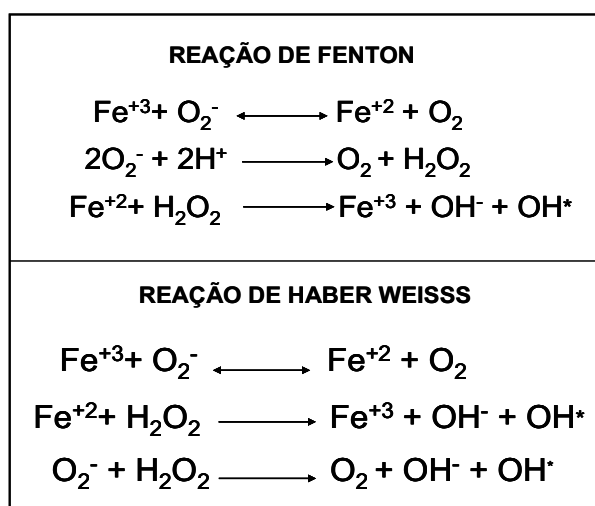


Figura 6- Reação de Fenton e de Harber Weiss.

A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela

glutationa oxidada (GSSG). Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (ROSS; MOLDEUS, 1991; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 2002b; HALLIWELL, 2007a).

Embora os organismos aeróbicos possuam este sistema de defesa antioxidante e terem sistemas de reparo que evoluíram para protegê-los contra danos oxidativos, estes sistemas são insuficientes para impedir inteiramente os danos causados pelas ERMOs. Desta forma é essencial o equilíbrio entre oxidantes (ERMOs) e o sistema de defesa antioxidante (Figura 7). Assim torna-se necessário a descoberta e uso de antioxidantes eficazes no combate a esses radicais de modo que possam limpá-los do corpo humano e reestabelecer o equilíbrio do sistema oxidante-antioxidante.

A fim de reduzir os danos ao corpo humano, antioxidantes sintéticos são usados atualmente em processos alimentícios industriais. Os antioxidantes mais comuns em tais processos são o BHA (butilato hidroxianisol), BHT (butilato hidroxitolueno) e TBHQ (tert-butilhidroxiquinona). Entretanto dados na literatura indicam que estes antioxidantes sintéticos podem ser os responsáveis pela causa de danos ao fígado e processos carcinogênicos (GRICE, 1988; QI, et al., 2005).

Desta forma, atualmente, tem aumentado o interesse em se encontrar antioxidantes naturais que possam proteger o corpo humano dos danos dos radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas (KINSELLA, et al., 1993; NANDITA; RANJINI, 2004). Compostos fenólicos, carotenóides e as vitaminas E e C são utilizados como fontes de antioxidantes naturais (HALLIWELL, 2002b), porém, há desvantagens em alguns destes antioxidantes. Os carotenóides, compostos fenólicos e vitamina E possuem desvantagens por serem insolúveis em água. Embora a vitamina C seja hidrossolúvel, ela é altamente sensível a luz e facilmente degradada (HEO, et al., 2005). Embora as vitaminas C e E componham em grande parte os sistemas antioxidantes biológicos, elas são instáveis e possuem alguns efeitos prooxidantes (MAYO, et al., 2003). A existência de outros antioxidantes naturais tais como erva-mate (SALDANHA, 2005; PADILHA, 2007), óleo de oliva (azeite) (BÉLTRAN, et al., 2005), fucoxantinas e florotaninos (YAN, et al., 1996; 1999) não impede a busca por novas fontes alternativas. Extratos de plantas, como

por exemplo, de chá verde (NAKAGAWA; YOKOZAWA, 2002) possuem tais atividades, provavelmente isto se deve tanto a presença de compostos fenólicos, evidenciados por pigmentos, como também, da existência de polissacarídeos nestes extratos, pois a esses polímeros, em geral de plantas, são atribuídas fortes atividades antioxidantes (JIANG; JIANG; WANG, 2005; HU; XU; HU, 2003; RAMARAHNAM; OSAWA; OCHI, 1995).

Dados na literatura também mostram a atividade antioxidante realizada por polissacarídeos extraídos de fungos como os polissacarídeos solúveis em água, extraídos e purificados do fungo *Gynostemma pentaphyllum* (Makino) mostraram habilidade forte do seqüestro do radical superóxido (WANG; LUO, 2007). Além disso, polissacarídeos extraídos do fungo marinho *Keissleriella sp.* e seus derivados demonstraram-se fortes candidatos com potencial medicinal e efeitos não tóxicos pelo alto potencial de seqüestro de radicais e ações antioxidantes (SUN, et al., 2004). Estudos prévios indicaram que PS artificialmente, como os polissacarídeos extraídos e modificados (sulfatados) do fungo filamentoso marinho *Phoma herbarum sp YS4108* e seus derivados (YCP-S1 e YCP-S2) demonstraram um alto potencial de seqüestro de radicais superóxido (YANG, et al., 2005). Recentemente, um grupo específico de polissacarídeos sulfatados naturais vem chamando atenção como fonte de novos compostos antioxidantes naturais. Os PS naturais extraídos das algas marinhas *Porphyra haitanesis* (ZHANG, et al., 2003), *Fucus vesiculosus*, e *Padina gymnospora* (SOUZA, et al., 2007) que mostraram atividade antioxidante de seqüestro dos radicais superóxido e hidroxila como também preveniram a peroxidação lipídica.

Polissacarídeos sulfatados apresentam grande potencial farmacológico. No entanto, dados na literatura indicam que PS de vegetais ainda não foram avaliados quanto às suas atividades potenciais. Na tentativa de encontrar compostos naturais que venham a substituir a heparina, também como combater as ERMOS geradas de forma excedente nos seres humanos, o presente estudo centraliza-se nas atividades anticoagulantes e antioxidantes dos PS extraídos do capim do mar *H. whrightii* como descritos a seguir.

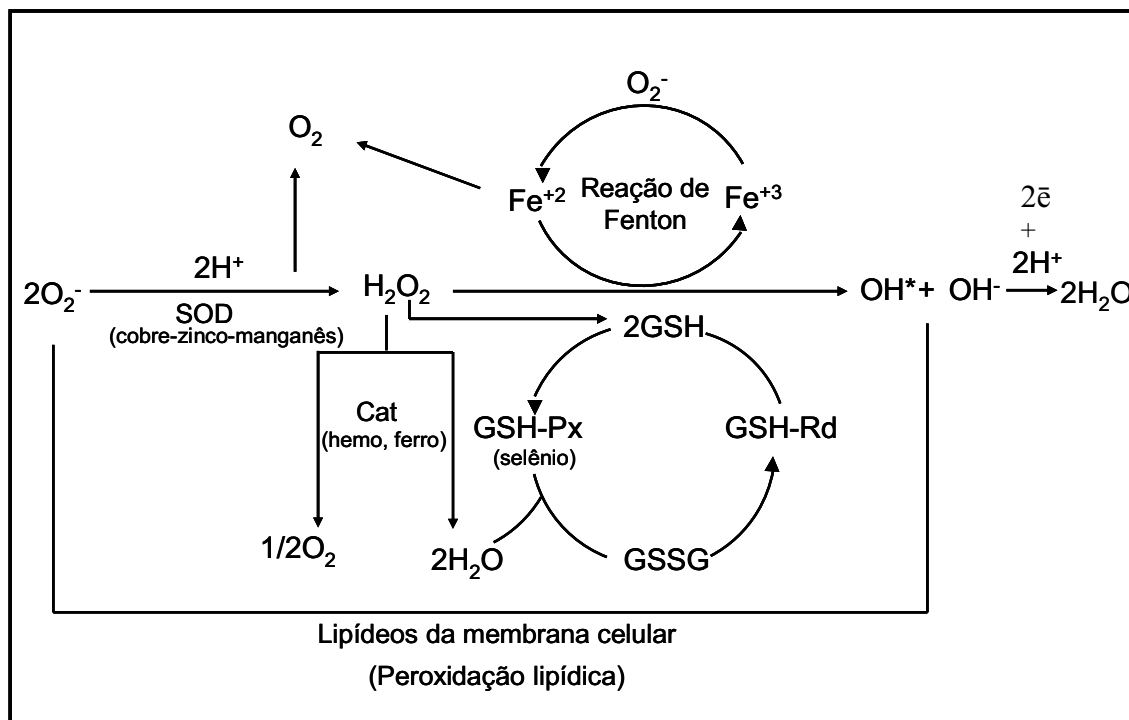


Figura 7 - Enzimas e seus respectivos cofatores no mecanismo de ação do sistema de defesa antioxidante contra as ERMOS a favor do estado antioxidativo. A superóxido desmutase (SOD) converte o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2). O $O_2^{\cdot-}$ participa também da peroxidação lipídica à medida que reage com ácidos graxos da membrana celular gerando radicais hidroxila (OH^{\cdot}) que são posteriormente convertidos em água (H_2O). A Cat (catalase) por sua vez converte o H_2O_2 em água (H_2O) e $1/2O_2$. O H_2O_2 participa também da reação de fenton que gera OH^{\cdot} convertendo-se posteriormente em H_2O . Além disso, o H_2O_2 juntamente com a glutatona reduzida (GSH) sofrem ação da glutatona peroxidase (GSH-Px) obtendo-se como produto de reação a H_2O e a glutatona oxidada (GSSG) que é por sua vez renovada convertendo-se em glutatona reduzida (GSH) pela ação da glutatona redutase (GSH-Rd). e^- , elétron.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Extrair e caracterizar quimicamente os polissacarídeos sulfatados da angiosperma marinha *Halodule wrightii* como também avaliar o potencial anticoagulante e antioxidante dos polissacarídeos.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair polissacarídeos sulfatados da angiosperma marinha *Halodule wrightii*;
- Determinar a composição monossacarídica e teor de sulfato do extrato rico em polissacarídeos sulfatados (EPS);
- Localizar histologicamente estes polissacarídeos sulfatados nas diferentes partes do vegetal;
- Analisar a atividade anticoagulante desses compostos, utilizando kits comerciais de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e tempo de protrombina (PT);
- Verificar o potencial antioxidante deste extrato através de testes antioxidantes *in vitro*;

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL BIOLÓGICO

Filo: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem: Alismatales

Família: Cymodoceaceae

Gênero: *Halodule*

Espécie: *Halodule wrightii*



Figura 8 : Capim do mar da espécie *Halodule wrightii*.

Disponível em: < <http://aquat1.ifas.ufl.edu/halwri.jpg> >

Acesso em 10 jul 2008.

A angiosperma marinha *Halodule wrightii* conhecida popularmente como Capim do Mar foi coletada no porto de Guamaré (41 ppm de salinidade), litoral norte do estado do Rio Grande do Norte em maré baixa (entre 0.0 e 0.2 metros). Após ser coletada, *Halodule wrightii* foi levada ao laboratório (BIOPOL-laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais) onde foi lavada e retiradas as epífitas e inclusões calcárias sendo em seguida secada em estufa a 50° C, triturada de forma mecânica e guardada em recipientes apropriados.

3.2 – REAGENTES

- Acetona, metanol, etanol da CRQ (Diadema, SP).
- Ácido acético, cloreto de sódio da CRQ (Diadema, SP).
- Ácido sulfúrico, ácido clorídrico da CRQ (Diadema, SP).
- Ácido ascórbico da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).
- Álcool 96 ° da Sertanejo (Dix Septo Rosado, RN).
- Agarose adquirida da Byo Agency (São Paulo, SP).
- Butanol, tiosulfato de sódio da Nuclear (Diadema, SP).
- Azul de toluidina, vermelho de cresol, coomassie blue R 250 oriundos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA).
- Metanol da CRQ (Diadema, SP).
- Maxtase (protease alcalina P 126) da Biocon do Brasil Industrial Ltda. (Rio de Janeiro, RJ).
- 1,3 diaminopropano acetato (PDA) Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).
- Cloreto de ferro II, folin ciocalteau da Merk (Germany, Alemanha).
- Coomassie brilliant blue R da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).
- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), salicilato de sódio da Fluka (Seelze, Germany)
- EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).
- 3-(2-Piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-p,p'-disulfonico ácido monosódico hidratado 97%, ferrozina da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).
- Cetiltrimetilamônio brometo (CETAVLON) da CRQ (Diadema, SP).
- Ácido gálico da Nuclear (São Paulo, SP).
- Todos os demais reagentes foram da melhor qualidade disponível.

3.2.1 – PADRÕES

- Heparan sulfato, condroitim sulfato, dermatan sulfato da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).
- Clexane® da Sanofi Aventis. (São Paulo, SP).
- L-fucose, D-xilose, D-galactose, D-manose, D-glucose, D-arabnose, D-ramnose, foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA).

3.3 – APARELHOS

- Agitador orbital modelo 255-B da Fanem Ltda. (São Paulo, SP).
- Banho Maria e estufa de temperatura constante da Fanem Ltda. (São Paulo, SP).
- Bomba peristáltica Microperpex S modelo 2232 da LKB (Bromma, Suécia).
- Câmara para eletroforese em gel de agarose, modelo desenvolvido por Jaques e Col. (1968). Técnica Permatron Ltda. (São Paulo, SP).
- Centrífuga refrigerada CR 21 da Hitachi Koki Co. Ltda. (Tóquio, Japão).
- Espectrofotômetro Femto 700 plus da Femto Ind. Com. Instrumentos Ltda. (São Paulo, SP).
- Medidor de pH Orion Research, modelo 701 digital Ionalyzer (Cambridge, EUA).
- Micrótomo, modelo 820, da América Optical Company (New York, EUA).

3.4 – DELIPIDAÇÃO ETANÓLICA

A espécie *Halodule wrightii* utilizada neste trabalho foi submetida à despigmentação e delipidação com adição de dois volumes (2v) de etanol. Esta solução ficou à temperatura ambiente durante o período de 24 horas. Posteriormente, a mistura foi decantada e o resíduo posto para secar. Este resíduo foi denominado de Pó delipidado e foi utilizado em seguida para proteólise.

3.5 - OBTENÇÃO DO EXTRATO DE POLISSACARÍDEOS (PROTEÓLISE)

Para promover a extração e solubilização dos polissacarídeos sulfatados o pó delipidado foi submetido à proteólise. Para realização desta etapa foram adicionados dois volumes (2v) de NaCl 0,25 M ao pó cetônico de *Halodule wrightii* (260 g) tendo esta solução seu pH ajustado para 8,0 com NaOH. Adicionou-se a este material a enzima Maxatase (Proteolítica) na proporção de 15 mg da enzima a cada 1 g de pó cetônico. O recipiente com este material foi colocado em banho Maria a 60° C durante um período de 16 horas. Depois este material foi filtrado e o sobrenadante submetido a uma centrifugação (10.000 g, 10 minutos a 4° C). Após

centrifugação, o sobrenadante que contém todos os polissacarídeos solúveis foi denominado de crú de polissacarídeos (CP). A este CP foi adicionado 2v de metanol. Esta mistura foi deixada a 4° C por 24 horas. Após este período o material foi centrifugado (10.000 g durante 10 minutos a 4°C) sendo o sobrenadante descartado e o precipitado denominado de extrato bruto (EB).

3.6 - TRATAMENTO COM TCA (ÁCIDO TRICLOROACÉTICO)

Devido ao alto grau de contaminação, o extrato bruto (EB) de polissacarídeos foi submetido à precipitação com ácido tricloroacético (para descontaminação protéica). Foram utilizadas 2,2 g do EB para o preparo de uma solução de concentração 10 mg/mL de NaCl 1 M. Esta solução foi dividida e colocada em tubos de centrifuga sendo deixados em banho de gelo por 15 minutos a 4° C. Após este período e ainda em banho de gelo foi colocada uma alíquota de TCA 90 % na proporção 9:1 (EB:TCA) resultando em uma concentração final de 0,9 mg/mL deixando-se agir por mais 15 minutos ainda em banho de gelo. Após este período o material foi centrifugado (10.000 g, 15 minutos a 4° C). O sobrenadante foi reservado para precipitação com 2v de metanol por um período de 24 horas. No dia seguinte este material foi centrifugado (10.000 g, 10 minutos a 4° C) e o precipitado foi reservado e colocado para secar em bomba peristáltica na presença de NaOH para neutralização do ácido contido na amostra. Este material foi secado sobre pressão reduzida. O material foi denominado de extrato de polissacarídeos totais (EPT) e estava pronto para procedimentos posteriores.

3.7 - ANÁLISES QUÍMICAS

3.7.1 - DOSAGEM DE AÇÚCARES TOTAIS

Para quantificar o teor de açúcares totais de EB e EPT foi utilizado o método fenol / ácido sulfúrico como previamente descrito por Dubois et al. (1956). Este é um método colorimétrico que detecta a formação de um composto (furfural) por adição de fenol e ácido sulfúrico às amostras sendo a leitura realizada a 490 nm. Foi empregada como padrão uma solução de L-galactose.

3.7.2 - DOSAGEM DE SULFATO

O teor de sulfato total do EB e do EPT foram quantificados pelo método gelatina-bário como previamente descrito por Dodgson & Price (1962). É um método turbidimétrico em que após hidrólise ácida de EB e EPT em HCl 4N por 6 horas à 100° C adicionou-se o reativo gelatina-bário às amostras, formando em seguida o sulfato de bário que permaneceu suspenso e foi lido por turbidimetria. Foi utilizado como padrão uma solução de sulfato de sódio.

3.7.3 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Para determinação do teor de proteínas de EB e EPT foi utilizado o método de Bradford (1976). Este é um método colorimétrico que utiliza o corante de coomassie brilliant blue R e baseia-se na interação entre o corante e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas sendo a leitura realizada a 595 nm.

3.7.4 - DOSAGEM DE FENÓLICOS TOTAIS

Para quantificar o teor de compostos fenólicos foi utilizado o método de Chandler & Dods (1983). Este é um método colorimétrico que envolve o reativo de Folin- Ciocalteus e utiliza o ácido gálico (AG) como controle positivo. EPS (2 mg) foi adicionado a uma mistura que continha o reativo de Folin e carbonato de sódio (Na_2CO_3) 20%. Os tubos foram incubados a 40° C por 20 minutos. Em seguida, a leitura foi realizada no espectrofotômetro a 765 nm. A curva de AG foi realizada nas mesmas condições. Os resultados foram comparados ao do controle positivo (ácido gálico).

3.8 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A identificação parcial dos polissacarídeos foi realizada através do método de eletroforese em gel de agarose modificado por Dietrich & Dietrich (1976) utilizando o sistema de 1,3 diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M pH 9,0. O gel de agarose foi preparado na concentração 0,6 % em tampão PDA e colocado sobre lâminas de vidro (5 X 7,5 cm X 1,5 mm). Cinqüenta, cem e duzentos microgramas do extrato

bruto (EB) e do extrato de polissacarídeos totais (EPT) do capim do mar na concentração de 10 mg/mL foram aplicadas em canaletas nos géis e submetidos à eletroforese em cuba resfriada a 4 ° C. Nas eletroforeses realizadas foram utilizados como padrões os glicosaminoglicanos sulfatados: HS, CS e DS. Após a corrida eletroforética (a 100 Volts), os compostos foram precipitados com CETAVLON 0,1 % por no mínimo 2 horas a temperatura ambiente. Depois os géis foram submetidos a uma corrente de ar quente para serem secados e corados com azul de toluidina 0,1 %. O excesso de corante foi removido por uma solução de ácido acético 1 % em etanol 50 % (solução descorante). Após remoção do corante em excesso as lâminas reveladas foram secadas à temperatura ambiente e analisadas.

3.9 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho foi realizada em espectrômetro Perkin-Elmer de 4400 a 400 cm^{-1} no departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. O EPS (5 mg) foi analisado após secagem em aparelho de Abdenhalden sob forma de pastilha de KBr contendo P_2O_5 à 60° C.

3.10 - CROMATOGRAFIA EM PAPEL (SISTEMA DESCENDENTE)

O extrato rico em polissacarídeos sulfatados (EPS) foi submetido à hidrólise ácida HCl 2 N por duas horas a temperatura de 100° C. O hidrolisado foi secado e resuspendido 3 vezes em água sob pressão reduzida na presença de pastilhas de NaOH. Para análise da composição monossacarídica de EPS o hidrolisado do mesmo foi aplicado, separado e identificado no sistema de cromatografia descendente em papel Whatman nº 01 sendo para isto submetido ao seguinte sistema de solvente: acetato de etila: piridina: água (8: 2: 1). Os compostos com poder redutor foram visualizados através da revelação com prata em meio alcalino (TREVELYAN; PROCTER; HARRISON, 1950).

3.11 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada como proposta por Hilborn & Anastassiadis (1971) e modificada por Dietrich & Nader (1974). O gel de poliacrilamida foi preparado com 600 mg de poliacrilamida (6 %), 18 mg de

bisacrilamida (0,16 %) e 7 mg de persulfato de amônio adicionados a 10 mL de tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) (0.9 M Tris-Borato 0.02 M EDTA, pH 8.6). A solução foi submetida a vácuo durante 5 minutos a 4 °C. Após a adição de 10 µL de TEMED a solução foi transferida para placas de vidro conforme descrito por Vesterberg (1972). A eletroforese foi feita em gel de 5,0 x 7,5 cm por 0,2 cm de espessura. Foram utilizados 200 µg de cada extrato (EB / EPS) resuspendidos cada um em 2 µL e aplicados ao gel sobre pequenas tiras de papel Whatman nº 1, deixando-se 10 minutos a temperatura ambiente para permitir uma boa penetração do composto nas malhas do gel. A seguir este foi submetido a uma diferença de potencial de 8 V/cm durante aproximadamente 30 minutos. A visualização da migração dos compostos foi observada através de coloração com azul de toluidina 0,1 % em ácido acético 1 %. A descoloração foi realizada com ácido acético. Este método correlaciona a distância percorrida pelo composto com o inverso do logaritmo de sua massa molecular. Os pesos moleculares foram determinados tomando como referência as migrações do heparam sulfato C (HSC - 9.3 kDa) e heparam sulfato D (HSD - 4.5 kDa); condroitim sulfato (CS - 58 kDa); heparam sulfato (HS -13 kDa) e Clexane® (CL - 4 kDa) .

3.12 - CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA

3.12.1 - FIXAÇÃO

Para caracterização histoquímica uma porção de *Halodule wrightii* foi transportada e conservada em água salobra de seu hábitat até o laboratório onde foi logo em seguida adicionada a uma solução fixadora de FAA (formaldeído: ácido acético: álcool etílico 70 %) (1: 1:18). O capim do mar permaneceu imerso nesta solução por 48 horas a temperatura ambiente.

3.12.2 - TÉCNICAS PARA EMBLOCAMENTO

Após a fixação em FAA as porções vegetativas (raiz, caule e folha) de *H. wrightii* foram separadas e desidratadas a concentrações crescentes de álcool etílico para retirada de toda água contida nos tecidos sendo feita de forma gradual para que não houvesse danos aos tecidos. Em seguida o material foi submetido por várias vezes a concentrações crescentes de xilol para clareamento do tecido. Após a

desidratação e clareamento, as porções vegetativas foram incluídas em parafina para posteriores cortes e coloração. Os blocos de parafina contendo as porções vegetativas : raiz, caule e folha, foram submetidos a cortes de 10 µm. Este material foi posteriormente colocado em lâminas que foram em seguida desparafinadas, hidratadas e coradas com azul de toluidina 0,5 % , um corante que se liga a grupos ácidos como os polissacarídeos sulfatados. Posteriormente as lâminas foram cobertas por uma lamínula para posterior visualização dos resultados. (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983; BEHMER; TOLOSA; NETO, 1976).

3.13 - ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.13.1 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)

Para avaliar a capacidade antioxidante total de EPS foi utilizado o método de Pietro, Pineda & Aguilar (1999). Uma alíquota de 0,1 mL do EPS (mg/mL) foi combinada com 1 mL de solução reagente (0,6 M ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4mM de molibdato de amônio). Os tubos foram transferidos para uma estufa (95°C). Após 90 minutos o resultado da reação foi lido a 695 nm. Uma curva de vitamina C foi realizada nas mesmas condições e os resultados foram expressos por equivalentes de ácido ascórbico (YUAN et al., 2006).

3.13.2 - ATIVIDADE DE SEQÜESTRO DO RADICAL DPPH

Para avaliar a capacidade total de EPS em doar átomos de hidrogênio (reduzora) foi utilizado o método de seqüestro do radical DPPH de acordo com Yuan et al. (2005). Este é um método colorimétrico baseado na redução do radical DPPH, um radical relativamente estável, transformando-se no radical DPPHH em solução alcoólica e água (1:1). Diferentes massas de EPS (0,01-3,0 mg) foram dissolvidas em solução de metanol e água (1:1) seguido da adição de 1 mL de solução de DPPH 0,1 mM em metanol e água (1:1). Após a incubação de 30 minutos em temperatura ambiente os tubos foram lidos no espectrofotômetro a 517 nm. As porcentagens de sequestro (%) de DPPH foram calculadas como segue:

$$\% \text{ do sequestro do radical DPPH} = \left| 1 - \frac{ABS_{amostra}}{ABS_{branco}} \right| \times 100$$

Em que:

ABS_{branco} é a absorbância do branco (ausência do extrato);

ABS_{amostra} é a absorbância da amostra do extrato.

3.13.3 - ATIVIDADE DE PODER REDUTOR

Para confirmar a atividade antioxidante total de EPS foi realizado o teste de poder redutor segundo o método de Yen & Chen (1995). EPS em diferentes concentrações (0,01-0,50 mg/mL) foi adicionado a uma solução contendo $K_4[Fe(CN)_6]$ 1% , ácido tricloroacético (TCA) 10 % e $FeCl_2$ 0,1 % em tampão fosfato pH 6,6. Os tubos contendo a reação foram à 50° C por 20 minutos sendo em seguida lidos no espectrofotômetro a 700nm. Uma curva de vitamina C (controle positivo) foi realizada nas mesmas condições acima. Os resultados foram comparados com os da vitamina C.

3.13.4 - ATIVIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL HIDROXILA

Para avaliar a capacidade de EPS em seqüestrar o radical OH^\cdot foi realizado o teste de seqüestro deste radical pelo método modificado de Smirnoff & Cumbes (1989). EPS em diferentes concentrações (0,01-0,50 mg/mL) foi misturado a uma solução que continha $FeCl_2$ 10mM, EDTA 10mM, salicilato de sódio 2mM, H_2O_2 30% em tampão fosfato de sódio 150mM pH 7.4. Os tubos foram incubados por 1h à 37° C em banho-maria sendo em seguida lidos no espectrofotômetro a 510 nm. O controle foi realizado nas mesmas condições e na ausência de sequestrantes. Para o branco o H_2O_2 foi substituído por tampão fosfato de sódio 150mM pH 7.4 e a reação ocorreu na ausência de sequestrantes.

As percentagens de inibição das amostras foram avaliadas de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ seqüestro do radical} = \frac{ABS_{\text{controle}} - ABS_{\text{amostra}}}{ABS_{\text{controle}} - ABS_{\text{branco}}}$$

Em que:

ABS_{controle} é a absorvância do sistema gerador de radicais (ausência do extrato);

ABS_{amostra} é a absorvância da amostra do extrato;

ABS_{branco} é a absorvância do branco (ausência do extrato).

3.13.5 - ATIVIDADE QUELANTE DE METAL

Para avaliar a habilidade do EPS em quelar metal foi realizado o método de Decker & Welch (1990) modificado. Foi utilizado EPS em diferentes concentrações (0,10-2,00 mg/mL) e misturados ao $FeCl_2$ 2mM e à ferrozina 5mM. Aguardou-se 10 minutos e em seguida os tubos foram lidos no espectrofotômetro a 562 nm. Para o branco a amostra foi substituída por H_2O deionizada e para o controle positivo a amostra foi substituída pelo EDTA nas mesmas condições. Os dados foram adicionados à formula abaixo:

$$\% \text{ atividade quelante} = \left| 1 - \frac{ABS_{\text{amostra}}}{ABS_{\text{branco}}} \right| \times 100$$

Em que:

ABS_{amostra} é a absorvância da amostra do extrato;

ABS_{branco} é a absorvância do branco (ausência do extrato).

3.13.6 - ATIVIDADE DE SEQÜESTRO DO RADICAL SUPERÓXIDO

Para avaliar a capacidade do EPS em seqüestrar o radical O_2^- foi realizado o teste de seqüestro deste radical pelo método de Beuchamp & Fridovich (1971). EPS em diferentes concentrações (5-30 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado a uma solução que continha tampão fosfato de sódio 50mM (pH 7.4), metionina 13mM, riboflavina 2 μM , EDTA 100 μM e NBT 75 μM . Após 30 minutos, os tubos foram lidos no espectrofotômetro a 560 nm. Os dados foram adicionados a seguinte fórmula:

$$\% \text{ seqüestro do radical} = \frac{ABS_{\text{controle}} - ABS_{\text{amostra}}}{ABS_{\text{controle}} - ABS_{\text{branco}}}$$

Em que:

ABS_{controle} é a absorbância do sistema gerador de radicais (ausência do extrato);

ABS_{amostra} é a absorbância da amostra do extrato;

ABS_{branco} é a absorbância do branco (ausência do extrato).

3. 14 - ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

3.14.1 - PREPARO DO PLASMA HUMANO

O sangue humano foi coletado sobre citrato de sódio (concentração final de 3,2 %), sob leve agitação em frasco de polietileno esterilizado. O plasma foi separado por centrifugação e alíquotas de 1 mL estocadas a -20 ° C em microtubos de 1,5 mL esterilizados.

3.14.2 - TESTES DE aPTT E PT

Para avaliar o potencial anticoagulante de EPS foram realizados os ensaios de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e tempo de protrombina (PT) utilizando-se kits comerciais adquiridos da Labtest. O plasma citratado utilizado nestes ensaios foi obtido após a centrifugação de sangue humano retirado de indivíduos adultos saudáveis e de ambos os sexos.

Foi verificada através de ensaios a massa do EPS necessária para prolongar o tempo de coagulação. Foi utilizado como meio de comparação para atividade anticoagulante a Clexane® (heparina de baixo peso molecular). O tempo de coagulação foi medido em segundos utilizando-se um coagulômetro automático.

3.15 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como \pm SD e a diferença significativa entre os grupos foi realizada pelo teste de Tukey-Kramer. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 - RESULTADOS

4.1- OBTENÇÃO DO EXTRATO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE *Halodule wrightii*

O capim do mar *Halodule wrightii* após ser coletado, lavado e posto para secar resultou em 260 g de material seco. Este material foi submetido à delipidação seco novamente sendo agora denominado de “pó delipidado”.

O pó delipidado foi submetido à proteólise que promoveu a extração e solubilização do crú de polissacarídeos. Este foi então precipitado com dois volumes (2v) de metanol. Após centrifugação e secagem, foram obtidos cerca de 2,20g de um precipitado que foi denominado de extrato bruto (EB).

Análises químicas demonstraram que o extrato bruto (EB) apresentou alto grau de contaminação protéica (Tabela III), desta forma, ele foi submetido à precipitação com TCA (ácido tricloroacético). Após esse procedimento obteve-se 380 mg do material que foi agora denominado de extrato de polissacarídeos totais (EPT). A Tabela III mostra que a contaminação protéica foi retirada após a precipitação com TCA e que houve um aumento na quantidade de polissacarídeo e sulfato, indicando que o procedimento utilizado promoveu uma parcial purificação dos polissacarídeos sulfatados presentes no extrato bruto.

TABELA III

Análises químicas do extrato bruto e do extrato de polissacarídeos totais do capim do mar *Halodule wrightii*

Amostras	Açúcares totais %	Proteínas %	SO ₃ %
EB	32,78	2,94	n.d
EPT (TCA)	58,96	< 0,4	20,63

EB-Extrato bruto

EPT- Extrato de polissacarídeos totais

n.d = não detectado

4.2 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.

As análises químicas (Tabela III) demonstraram a presença de polissacarídeos e de sulfato no EPT, indicando possivelmente a presença de polissacarídeos sulfatados. Para se verificar se esses grupos sulfatos estavam ligados covalentemente aos polissacarídeos, o EB e o EPT foram submetidos à eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3 diaminopropano acetato (PDA) 0,05 M pH 9,0. Para tal, os extratos de *Halodule wrightii* obtidos antes e depois da precipitação com TCA foram solubilizados em água destilada a uma concentração final de 10 mg/mL e submetidos à análise em eletroforese em tampão PDA. A corrida eletroforética se deu pela interação das moléculas dos extratos com as moléculas de diamina do tampão de maneira que quanto maior esta interação menor a corrida eletroforética.

A Figura 9A mostra o comportamento eletroforético do EB em diferentes concentrações. Pode-se observar que com o aumento da concentração o EB passa a mostrar uma maior polidispersão que é uma característica atribuída principalmente a polissacarídeos em eletroforese. Contudo, o que mais chama atenção é a coloração azulada assumida por esse extrato após coloração com azul de toluidina 0,6 %; coloração esta geralmente atribuída a polímeros contaminantes como proteínas e ácidos nucleicos. Desta forma esse extrato foi submetido a um processo de descontaminação utilizando-se o TCA, obtendo-se o EPT e realizando-se uma nova corrida eletroforética.

Na Figura 9B observa-se o perfil eletroforético do EPT. É notório que o EB após a precipitação ácida passou a apresentar uma coloração azul violácea (metacromasia) que é uma coloração típica assumida por polissacarídeos sulfatados quando corados por azul de toluidina 0,1 %, indicando a presença desses polímeros no extrato. Outro fato interessante observado nessa figura é que mesmo com o aumento da concentração do EPT não houve aumento na polidispersão dos polissacarídeos presentes sugerindo que a precipitação ácida eliminou os contaminantes que estavam interferindo na interação do EPT com as moléculas de diamino do tampão PDA e conseqüentemente no perfil de corrida eletroforético.

Essa maior uniformidade eletroforética é evidenciada pelo aumento da intensidade da coloração apresentada pela população de polissacarídeos sulfatados em uma mesma região à medida que ocorreu o aumento da concentração do extrato. A partir deste experimento comprovou-se a existência de grupos sulfatos ligados covalentemente aos polissacarídeos do extrato (metacromasia) que então foi denominado de EPS (extrato rico em polissacarídeos sulfatados).

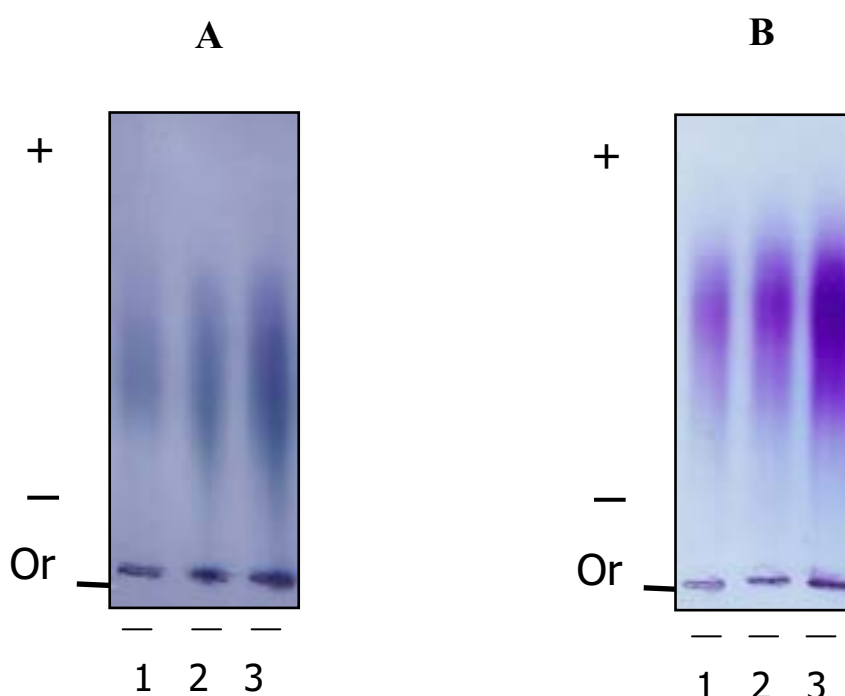


Figura 9 - Comportamento eletroforético dos extratos do capim do mar *Halodule wrightii*
Concentrações crescentes de 50, 100 e 200 µg dos extratos representadas acima pela numeração 1, 2 e 3 respectivamente foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese em agarose em tampão PDA 0,05 M pH 9,0. Posteriormente, as lâminas foram coradas em azul de toluidina 0,1 %. **A** – Corrida eletroforética do extrato bruto (EB). **B** – Corrida eletroforética do extrato de polissacarídeos totais (EPT). **Or.** – origem.

4.3 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Para ratificar a presença de grupos sulfatos ligados covalentemente aos polissacarídeos presentes no EPS de *Halodule wrightii* foi realizada a espectroscopia de infravermelho. Esta técnica fornece dados sobre a presença de determinados grupos químicos de um composto, caracterizando-o como um todo, devido ao fato de grupamentos funcionais darem origem a picos de absorção que se situam em

uma mesma frequência, independente da estrutura da molécula. Como descrito em métodos EPS foi submetido à espectroscopia de infravermelho e apresentou o pico mais proeminente na região de 3415 cm^{-1} que corresponde a vibrações de alongamento correspondentes aos grupos hidroxila (OH). Outros dois picos em 2925 e 1638 cm^{-1} correspondem ao estiramento C-H (presente nos anéis de piranoses) e à camada de solvatação criada pelas moléculas de água, respectivamente. Um pequeno pico em 1737 cm^{-1} pode ser assinalado como carbonilas de grupos acetato. O pico em 1252 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico S=O sugerindo a presença do grupamento sulfato ligado diretamente ao O do anel e o pico em 616 cm^{-1} corresponde a ligações de oxigênio a sulfato (O=S=O). O dado mais relevante com relação ao sulfato foi observado na região de 836 cm^{-1} que é um pico que surge quando se tem sulfato ligado ao carbono 2 de monossacarídeos. A Figura 10 representa os principais picos obtidos do EPS. Desta forma os resultados químicos e físico-químicos obtidos até aqui indicaram que EPS possui na sua constituição polissacarídeos sulfatados.

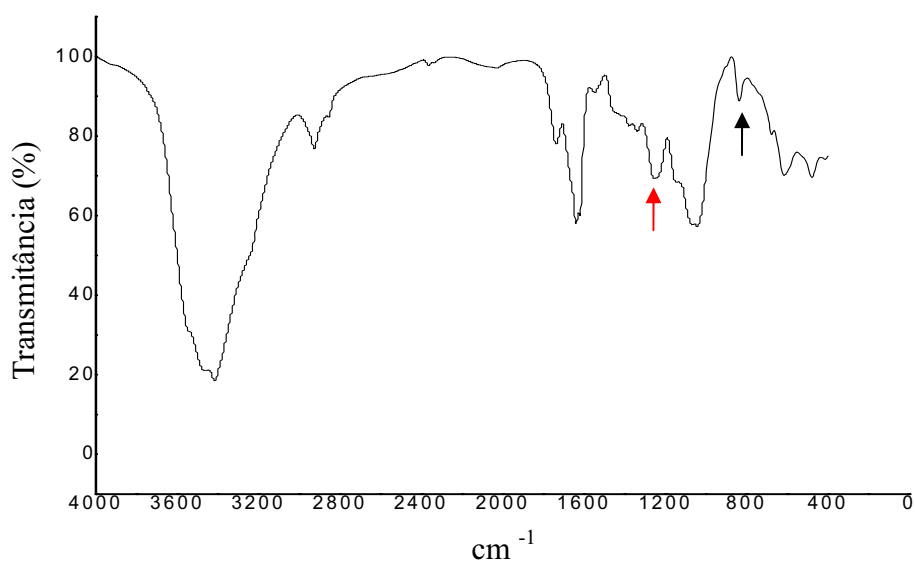


Figura 10 – Espectro de infravermelho de EPS com uma região entre $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$. Nesta figura estão representados os principais picos da espectroscopia de infravermelho de EPS. **Seta preta**, sulfatação no carbono 2 (836 cm^{-1}) (C2-O-S) . **Seta vermelha**, ligação do sulfato ao oxigênio (1252 cm^{-1}) (S=O).

4.4 - CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DE EPS

Com o intuito de analisar qualitativamente os monossacarídeos constituintes de EPS do capim do mar *H. wrightii* foi realizada uma cromatografia descendente em papel a partir do hidrolisado de EPS como observado em métodos (Figura 11).

Após revelação do cromatograma obtido com solvente acetato de etila: piridina: água foi possível constatar a presença de galactose, glicose e xilose como principais constituintes monossacarídicos. A quantificação desses monossacarídeos demonstrou que estes constituintes se apresentam numa relação molar muito próxima (Tabela IV).

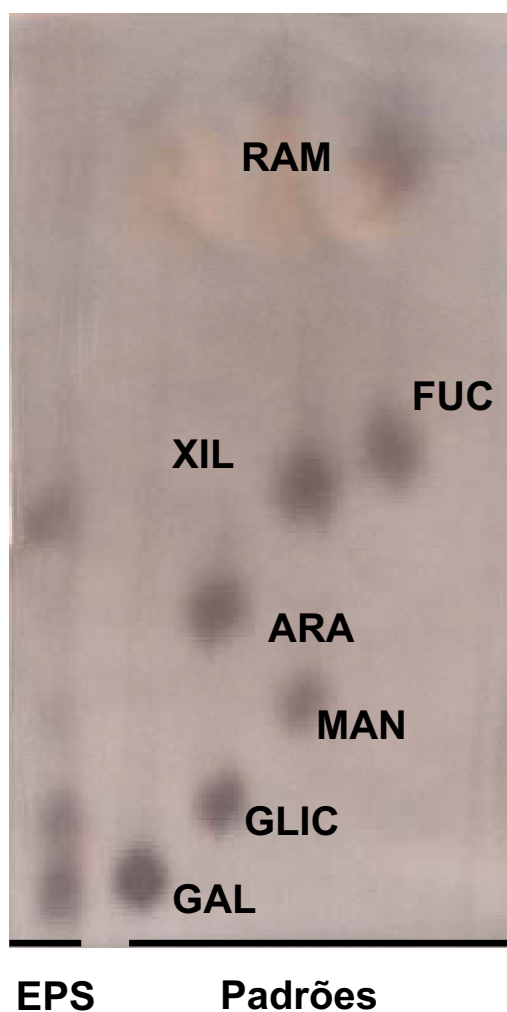


Figura 11 - Cromatografia descendente em papel do hidrolisado de EPS. Uma alíquota de 20 μL (200 μg) foi aplicada na origem correspondente juntamente com o padrão de monossacarídeos e submetida à cromatografia no solvente acetato de etila: piridina: água (8:2:1); **EPS**, extrato rico em polissacarídeos sulfatados; **FUC**, fucose; **RAM**, ramnose; **MAN**, manose; **ARA**, arabnose; **XIL**, xilose; **GLIC**, glicose; **GAL**, galactose.

4.5 - ANÁLISES QUÍMICAS DO EPS DE *Halodule wrightii*

A Tabela IV resume os dados obtidos com as dosagens químicas de açúcares e fenólicos também como as relações molares entre os monossacarídeos constituintes e o sulfato. As análises demonstraram um alto teor de açúcar de EPS e baixa contaminação por compostos fenólicos que são antioxidantes conhecidos que podem ser bastante encontrados em extratos de plantas. Além disso, pode-se observar que a relação molar entre xilose, glicose, galactose e de sulfato é muito semelhante sendo em torno de 1: 1: 1: 1.

TABELA IV

Relação molar dos açúcares e sulfato presentes no EPS do capim do mar *Halodule wrightii*

Amostra	Fenólicos%	Açúcar Total %	Relação molar			
			GAL ¹	GLIC ¹	XIL ¹	SO ₃
Extrato rico em polissacarídeos sulfatados	<0,3	58,96	0,90	1,0	1,0	1,0

¹ Relação molar de açúcar tendo a xilose como referência; **GAL**, galactose; **GLIC**, glicose; **XIL**, xilose; **SO₃**, sulfato.

4.6 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DE EPS

Para se determinar a massa molecular média dos polissacarídeos do EPS de *Halodule wrightii* e observar se o tratamento com TCA não causou alterações nos polissacarídeos do EB, estes foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 12).

Após revelação da lâmina foi possível verificar que o EB e o EPS apresentaram um perfil eletroforético semelhante indicando que o processo de descontaminação do extrato bruto com TCA, como descrito em métodos, não promoveu quebra detectável de EPS. As massas moleculares foram estimadas tomando como referências as migrações do heparam sulfato C (HSC -9.300 Da) e do heparam sulfato D (HSD - 4.500 Da); do condroitim sulfato (CS -58.000 Da); do heparam sulfato (HS - 13.000 Da) e da Clexane® (CL - 4.700 Da). Sendo assim a massa calculada para a população de polissacarídeos do EPS foi de ~11.000 Da.

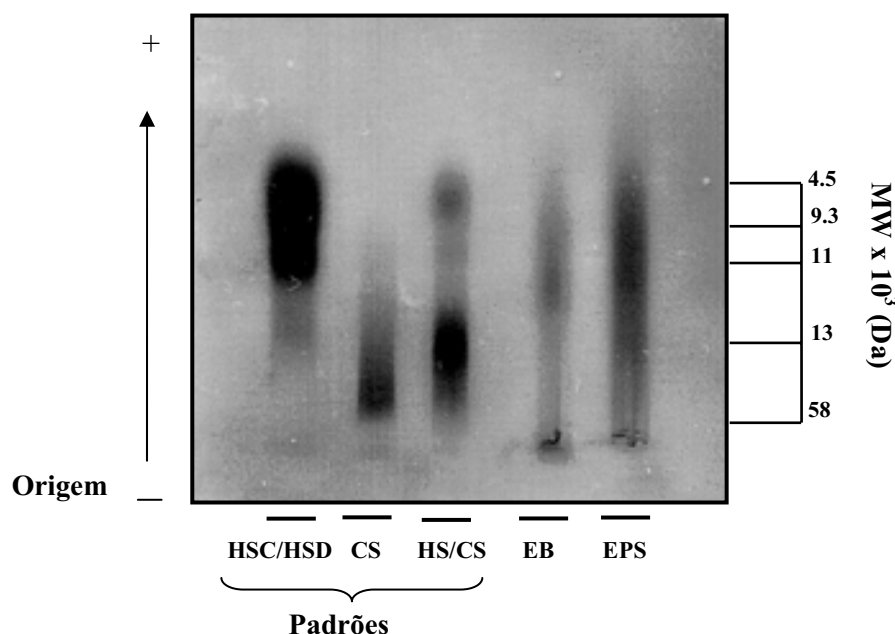


Figura 12 - Comportamento eletroforético de EB e EPS de *Halodule wrightii*. Aliquotas de 2 μ l (200 μ g) do EB e de EPS de *Halodule wrightii* foram aplicadas em eletroforese em gel de poliacrilamida em tampão TBE (0.9 M Tris-Borato 0.02 M EDTA, pH 8.6) e corados com azul de toluidina 0,1% conforme descrito em métodos. **EB**, extrato bruto; **EPS**, extrato rico em polissacarídeos sulfatados; **HSC**, heparam sulfato de 9.300 Da; **HSD**, heparam sulfato de 4.500 Da; **HS**, heparam sulfato de 13.000 Da; **CL**, Clexane® de 4.000 Da; **CS**, condroitim sulfato de 58.000 Da; **Or**, origem.

4.7 - ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Uma vez comprovada a presença de PS em *Halodule wrightii* foram realizadas análises histológicas para determinar a localização destes polissacarídeos no vegetal. Desta forma foram feitas lâminas histológicas com as porções vegetativas: raiz, caule e folha de *H. wrightii* utilizando-se o corante azul de toluidina 0,5 % (Figura 13).

A folha de *H. wrightii* apresenta uma camada externa (epiderme) composta por células cubóides e camadas internas (córtex) compostas por células que apresentam formas e tamanhos diferentes. O caule de *H. wrightii* apresentou camadas de células semelhantes às da raiz. Tanto para folha como para o caule não foi observado aumento da intensidade de marcação nas células da epiderme e do córtex pelo azul de toluidina 0,5%.

A raiz de *H. wrightii* é composta por células cubóides na camada mais externa (epiderme) e células da camada mais interna (córtex) com formatos semelhantes

tendo-se desta forma uma composição celular mais homogênea compondo a epiderme e o córtex. Para as células da epiderme foi possível observar um aumento da intensidade de marcação pelo azul de toluidina 0,5%, indicando a presença de polissacarídeos sulfatados nesta região. Diante dos resultados é possível dizer que os PS de *H. wrightii* encontram-se localizados na porção vegetativa raiz.

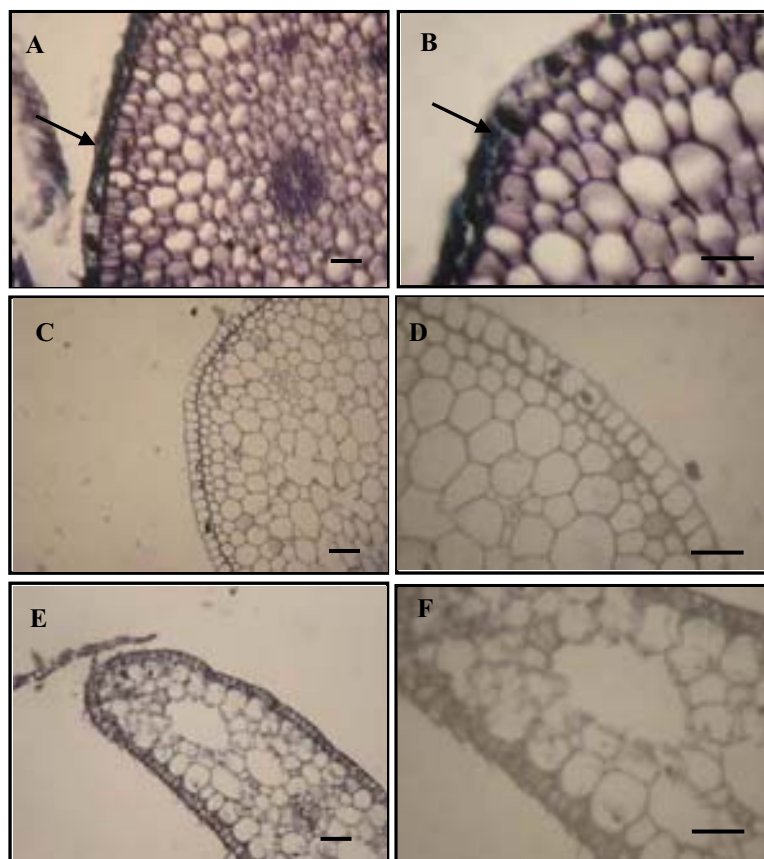


Figura 13 - Lâminas histológicas das porções vegetativas: raiz, caule e folha de *Halodule wrightii* em azul de toluidina 0,5 %. A-raiz (200x); B-raiz (400x); C-caule (200x); D-caule (400x); E-folha (200x); F-folha (400x). Barra (50 μ m). As setas indiciam a presença de polissacarídeos sulfatados.

4.8 - ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE EPS

4.8.1 - CAT - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Para iniciar os testes de atividade antioxidante foi realizado primeiramente um teste de capacidade antioxidante total (CAT) utilizando-se o composto em questão, para tanto foi realizado o ensaio de CAT como descrito em métodos. A CAT foi analisada pela capacidade do EPS em reduzir o molibdênio (Mo VI / Mo V) em

meio ácido com formação do complexo fosfato-molibdênio. Os dados foram comparados aos resultados da curva de ácido ascórbico que foi realizada nas mesmas condições. Cada mg do extrato rico em polissacarídeos sulfatados (EPS) apresentou uma CAT equivalente a atividade realizada por 15,21 μg de ácido ascórbico. (SD \pm 0,474; $p=0,0003$). Os PS do EPS não apresentaram bons resultados utilizando-se o método de CAT, desta forma foi realizado um outro teste capaz de analisar a capacidade antioxidante total do EPS.

4.8.2 - ATIVIDADE DE SEQÜESTRO DO RADICAL DPPH

Dados na literatura indicam a atividade de seqüestro do radical DPPH como indicativo de capacidade antioxidante total. Desta forma o teste de seqüestro do radical DPPH foi realizado e observou-se uma atividade dose dependente para atividade de seqüestro do radical DPPH pelo EPS do capim do mar de *H.wrightii*. A Figura 14 mostra concentrações crescentes do polissacarídeo (0,0025-0,750 mg/mL) e a percentagem de inibição do radical. Observa-se um aumento do seqüestro do radical com o aumento da concentração do extrato. A reação atinge seu ponto máximo de inibição em 41,36 % utilizando 0,5 mg/mL de EPS. O percentual de seqüestro em 0,75 mg/mL não foi considerado significativo com relação a concentração anterior (0,50 mg/mL).

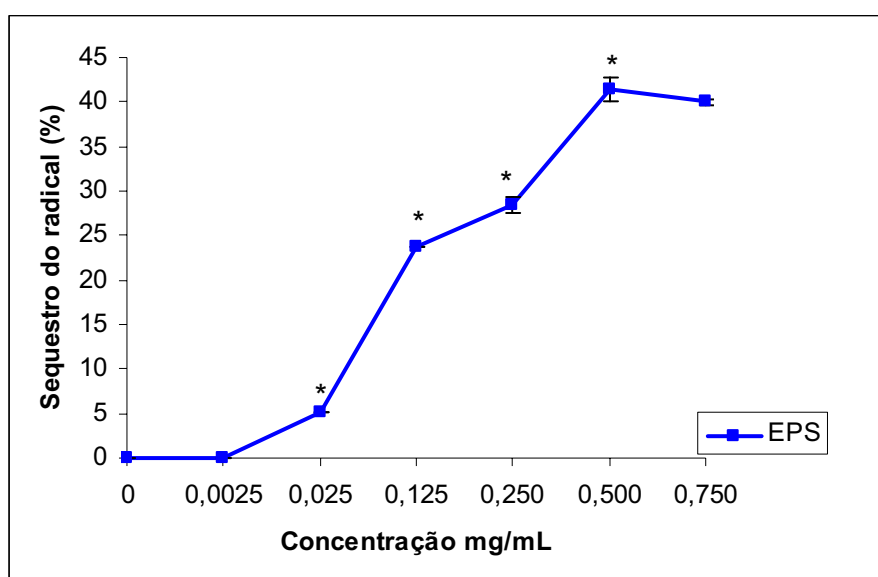


Figura 14 - Seqüestro do radical DPPH. Os dados apresentados foram expressos como média \pm SD. O nível de significância das amostras foi avaliado segundo teste de Tukey-Kramer utilizando como base $p<0,05$ indicando significância, $n=6$.

4.8.3 - ATIVIDADE QUELANTE DE METAL

Testes que avaliam a capacidade de um composto em quelar metais também são considerados testes antioxidantes à medida que os metais são capazes de gerar radicais livres. Desta forma para avaliar a capacidade de EPS em quelar metais foram utilizadas diferentes concentrações de EPS (0,10-1,25 mg/mL) para realização da atividade quelante de metal (Fe). EPS não apresentou atividade quelante quando comparado ao controle positivo (EDTA) nas mesmas condições. O EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) apresentou uma percentagem de quelação de 5,15 % utilizando-se apenas 10 µg, enquanto que o EPS apresentou apenas 3 % utilizando-se 100 µg (Figura 15).

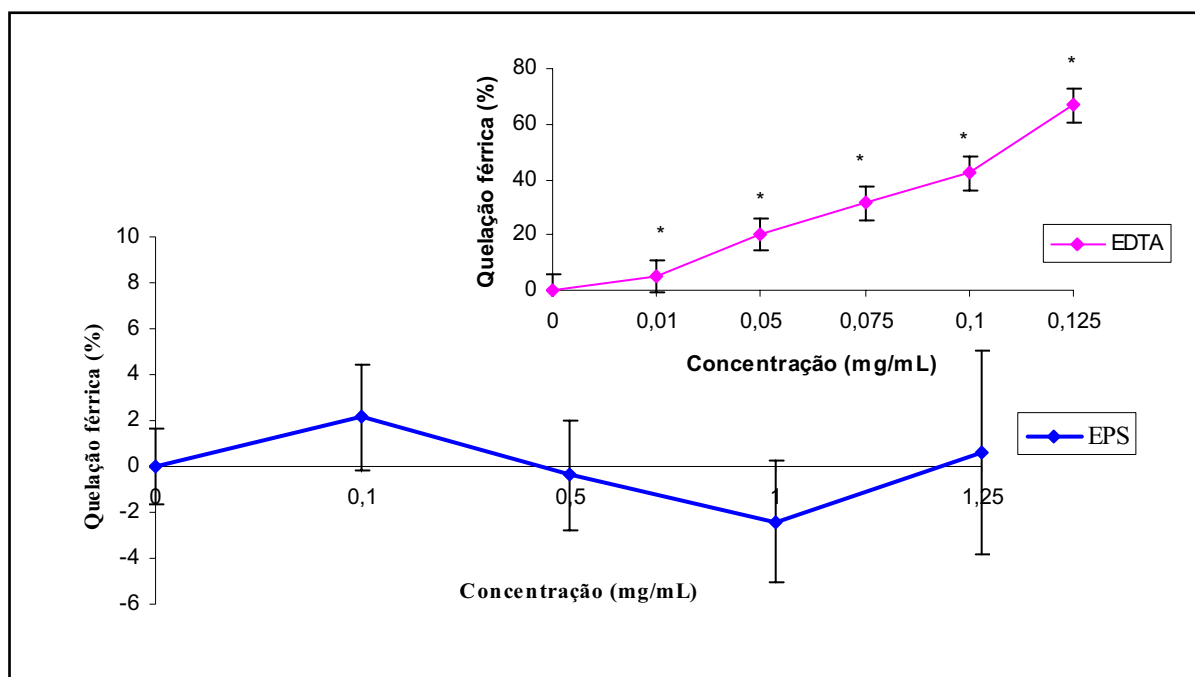


Figura 15 - Quelação férrica de EPS. Em azul observa-se a porcentagem de quelação férrica pelo EPS e em rosa a porcentagem de quelação férrica pelo EDTA (ácido etilendiamino tetra acético). Os dados apresentados foram expressos em média \pm SD. O nível de significância das amostras foi avaliado segundo teste de Tukey-Kramer utilizando como base $p < 0,05$ indicando significância, $n=9$.

4.8.4 - ATIVIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL HIDROXILA

O teste de seqüestro do radical hidroxila é um teste antioxidante bastante utilizado e avalia a capacidade de um composto em seqüestrar radicais hidroxila que são os mais reativos e prejudiciais aos organismos. Desta forma foram utilizadas diferentes concentrações de EPS (0,01-0,50 mg/mL) para realização da atividade de

seqüestro do radical hidroxila. EPS não apresentou atividade de seqüestro do radical hidroxila alcançando um máximo de 1,3 % utilizando-se 0,010 mg/mL do composto (Figura 16). Esta atividade se manteve constante até a concentração máxima utilizando-se 0,50 mg/mL.

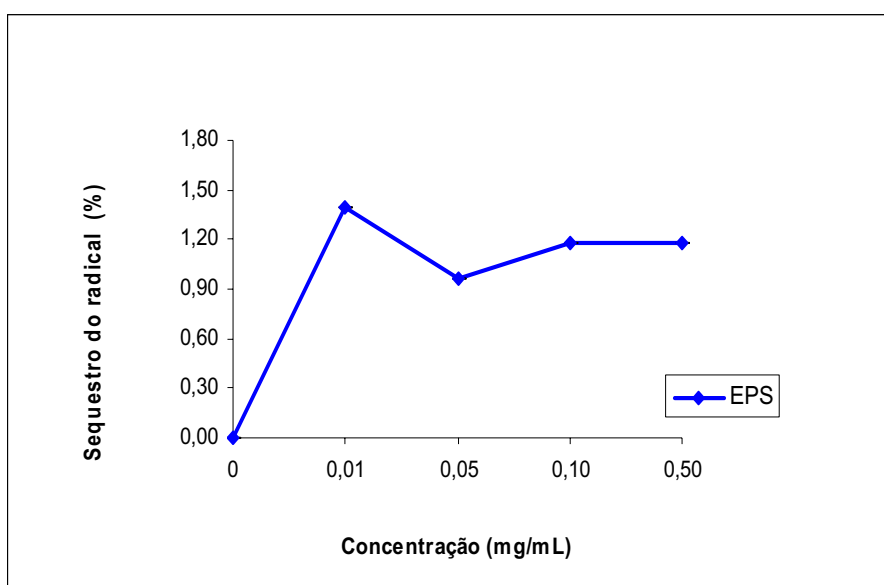


Figura 16 - Seqüestro do radical hidroxila. Os dados apresentados foram expressos em média \pm SD ($< 5\%$) O nível de significância das amostras foi avaliado segundo teste de Turkey-Kramer utilizando como base $p < 0,05$ indicando significância, $n=9$.

4.8.5 - SEQÜESTRO DO RADICAL SUPERÓXIDO

O teste de seqüestro do radical superóxido também avalia o potencial antioxidante de um composto por sua capacidade em seqüestrar este radical impedindo assim a formação de outros radicais mais reativos que seriam formados a partir dele. Os resultados indicaram que o potencial de seqüestro de EPS foi duas vezes maior do que o do ácido gálico (AG) quando ambos estavam na concentração de 0,05 mg/mL (Figura 17). Contudo a atividade de EPS não se modificou com o aumento da concentração (0,005-0,03 mg/mL), diferentemente do ácido gálico que teve um efeito dose-dependente durante todo o intervalo.

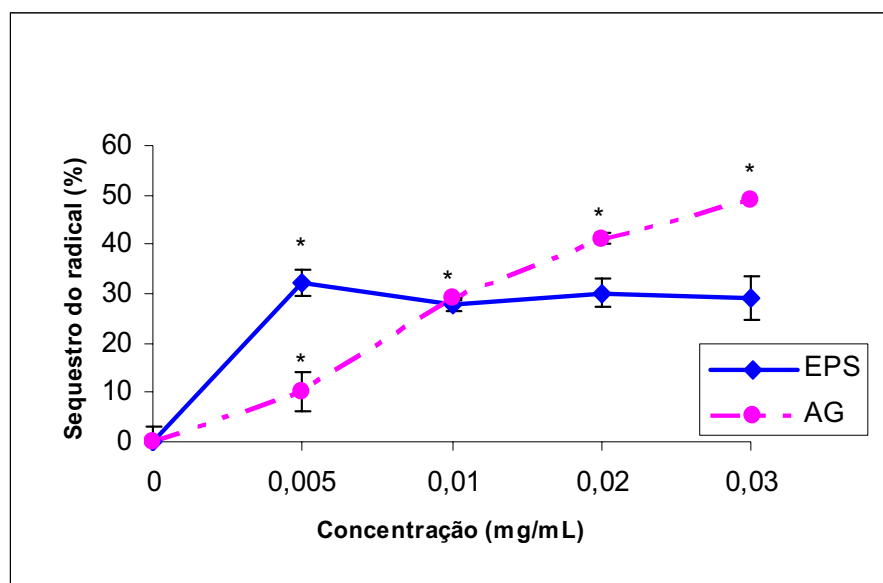


Figura 17 - Seqüestro do radical superóxido. Em azul observa-se a porcentagem de seqüestro do radical superóxido pelo EPS e em rosa a porcentagem de seqüestro do radical superóxido pelo AG (ácido gálico). Os dados apresentados foram expressos em média \pm SD. O nível de significância das amostras foi avaliado segundo teste de Turkey-Kramer utilizando como base $p < 0,05$ indicando significância, $n=9$.

4.8.6 - PODER REDUTOR

Para confirmar o teste de capacidade antioxidante total foi realizado o teste de poder redutor que é considerado um teste de atividade antioxidante por avaliar a capacidade de um composto em doar elétrons podendo estabilizar um radical ou transformá-lo em outro radical menos reativo. Desta forma para o ensaio de poder redutor foram utilizadas diferentes concentrações de EPS (0,01-0,5 mg/mL) (Figura 18). Neste teste EPS apresentou um efeito dose-dependente atingindo um poder redutor máximo na concentração de 0,25 mg/mL. Nesta concentração EPS representou 50% do poder redutor da vitamina C.

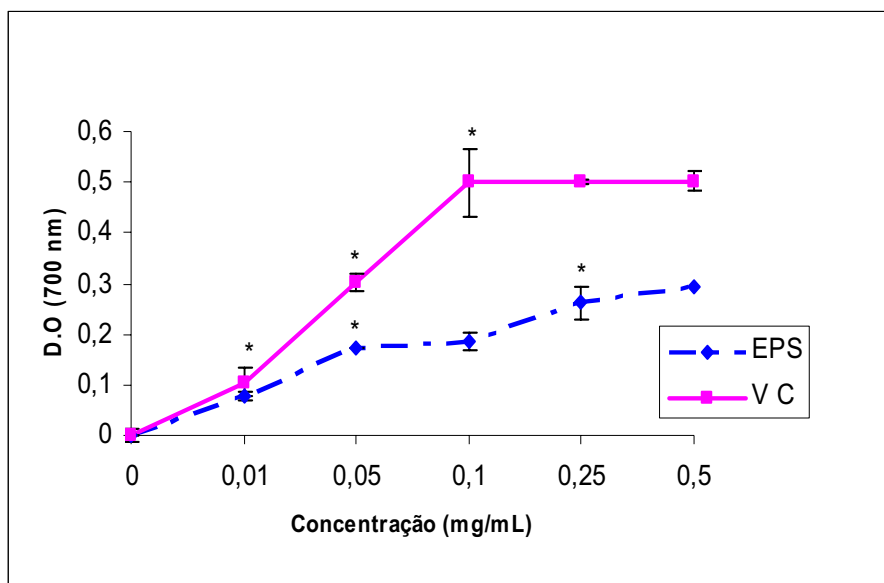


Figura 18 - Análise do poder redutor. Em azul observa-se o poder redutor do EPS e em rosa o poder redutor da VC (vitamina C). Os dados apresentados foram expressos em média \pm SD. O nível de significância das amostras foi avaliado segundo teste de Turkey-Kramer utilizando como base $p < 0,05$ indicando significância, $n=9$.

4.8.7 - ATIVIDADES ANTICOAGULANTES

EPS foi também submetido a testes de atividade anticoagulante como descrito na metodologia utilizando-se “kits” comerciais de aPTT (via intrínseca da coagulação) e de PT (via extrínseca da coagulação).

Os resultados dos testes mostraram que EPS não alterou o tempo de coagulação no teste de PT em todas as condições utilizadas. Analisando-se os dados obtidos para aPTT, EPS apresentou uma atividade anticoagulante considerável, conseguindo dobrar o tempo de coagulação com 20 μ g, que é aproximadamente apenas duas vezes e meia a concentração necessária da heparina de baixo peso (Clexane®) para apresentar a mesma atividade anticoagulante. Além disso, o efeito anticoagulante de EPS mostrou-se dose-dependente. Os resultados dos testes de aPTT e PT realizados com EPS de *H. wrightii* e comparados aos obtidos com as heparinas (não fracionada e Clexane®) podem ser visualizados na Tabela V.

TABELA V
Atividade anticoagulante de EPS e de heparinas

<i>Composto</i>		<i>Ensaio</i>	
		PT	aPTT
Controle		12.2s	31.5s ± 0,8
EPS	2,5µg	11.2s	32.4s ± 1,2
	5,0µg	12.3s	32.2s ± 0,7
	10µg	12.9s	49.2s ± 2,7
	*20µg	11.4s	# 63,2s ± 3,7
	40µg	11.9s	# 123.5s ± 1,7
	80µg	12,0s	# > 240
Heparina	*0,8µg	-	# 62,3s ± 2,2
Clexane®	*8,0µg	-	# 66.2s ± 2,7

*massa necessária (µg) para dobrar o tempo normal de coagulação;

os valores foram considerados significativos com $p < 0,05$ e $n=6$.

5 – DISCUSSÃO

Os Polissacarídeos sulfatados (PS) são macromoléculas que apresentam diversas atividades biológicas e farmacológicas, o que lhes dá um grande potencial para aplicação em várias atividades humanas, como na medicina, em indústrias biotecnológicas, farmacêuticas e alimentícias (TOIDA et al., 2003; LEE et al., 2004). Estes polímeros não são encontrados em todos os seres vivos, eles ocorrem com mais frequência em animais e macroalgas marinhas (ROCHA et al., 2006). Quando da extração desses polímeros a partir de tecidos animais tem-se um rendimento muito baixo. Por outro lado, não há cultivo extensivo de diversas macroalgas cujos polissacarídeos apresentaram atividade farmacológica. Esses e outros fatores impulsionam pesquisas por outras fontes de PS.

Vegetais são as principais fontes de recursos naturais renováveis no mundo atual. São cultiváveis e culturalmente aceitos como alimentos, fontes de matérias primas, inclusive várias com aplicações farmacológicas. Recentemente, foi relatada a presença de PS em vegetais. Entretanto, ainda não foram descritas atividades farmacológicas para esses polímeros de vegetais (AQUINO et al., 2005; SANTOS, 2007). No intuito de começar a preencher essa lacuna, este trabalho extraiu e avaliou atividades antioxidante e anticoagulante de PS do vegetal marinho *H. wrightii*.

Utilizando uma metodologia que combina proteólise e precipitação com metanol e posteriormente por TCA, conseguiu-se obter um extrato rico em PS de *H. wrightii* denominado de EPS (extrato rico em polissacarídeos sulfatados). As análises físico-químicas demonstraram que os PS presentes em EPS apresentam uma massa molecular média de 11kDa. Não há relatos das massas moleculares de PS de vegetais, portanto uma comparação só pode ser feita com PS de outros organismos. Essa massa pode ser considerada alta ou baixa dependendo do tipo de PS que for utilizado para comparação. Por exemplo, heparina com massas moleculares em torno de 10-20 kDa são consideradas moléculas de alta massa (BOUÇAS et al., 2006), já fucanas com massa de 21 kDa (LEITE et al., 1998; ROCHA et al., 2005) são consideradas de baixa massa molecular. Espera-se que com o avanço das pesquisas com PS de vegetais haja melhor parâmetros para se afirmar se a massa observada para os PS de *H. wrightii* seja alta ou baixa.

As análises químicas indicaram a presença de xilose, glicose, galactose e sulfato no PS de *H. wrightii*. Esta composição se assemelha com aquela observada para os PS de vegetais ducícolas cuja composição é: glicose, galactose, xilose, manose e arabinose (SANTOS, 2007). Esses dados também mostram que os PS de *H. wrightii* são bastante diferentes daqueles sintetizados por algas marinhas marrons e vermelhas (KLOAREG; QUATRANO, 1988; LEITE et al., 1998), bem como destes com relação aos glicosaminoglicanos sulfatados sintetizados pelos animais (MEDEIROS et al., 2000, NADER et al 2004; BRITO et al., 2008). Os dados apontam para a afirmação de que os PS de vegetais, inclusive do capim do mar *H. wrightii*, se assemelham mais com aqueles sintetizados pelas algas verdes, que são em sua maioria compostos por vários monossacarídeos. Contudo, nestes seres há uma predominância de um monossacarídeo em detrimento dos demais de acordo com a ordem a que pertence à alga. Por exemplo, polissacarídeos das algas verdes da ordem Codiales são mais ricos em arabinose ou galactose, enquanto que os da ordem Caulerpales e Ulvales são principalmente constituídos de galactose ou ramnose (ROCHA et al., 2006; QI et al., 2005). Por outro lado, as raras β -homogalactanas (MATSUBARA, 2004; FARIAS et al., 2008) de algas verdes purificadas apresentam um padrão de sulfatação diferente daquele apresentado pela β -homogalactana do capim do mar *Ruppia maritima* (AQUINO et al., 2005). Em resumo, os dados desse trabalho e os dados publicados com relação a PS de vegetais indicam que esses polímeros são estruturalmente diferentes daqueles encontrados em outros seres (as algas e os animais) então desta forma podem possuir um grande potencial biotecnológico.

Compostos tidos como antioxidantes podem realizar sua função antioxidante através da capacidade de seqüestrar radicais; quelar metais que contribuem para as reações oxidantes; assim como, inibir ou atenuar a produção de oxidantes endógenos ou estimular a produção de antioxidantes naturais dos organismos vivos. Desta forma foram realizados os seguintes testes de atividade antioxidante com EPS: CAT (capacidade antioxidante total), seqüestro do radical DPPH, atividade quelante de metal, atividade de seqüestro do radical hidroxila, atividade de seqüestro do radical superóxido e atividade de poder redutor.

Os dados de CAT indicaram que EPS não apresentou potencial antioxidante utilizando este método devido a cada grama de EPS corresponder à capacidade antioxidante total de apenas 15,21 mg de ácido ascórbico. Outros extratos ricos em PS apresentaram resultados neste teste, a medida em que cada grama dos extratos das algas *Spatoglossum schroederi* e *Dictyota mertensis* apresentaram 14,4 mg e 18,2 mg, respectivamente, correspondentes de ácido ascórbico (COSTA et al., 2008) o que parece indicar que PS não apresentam bons resultados neste teste.

Há relatos na literatura que indicam testes antioxidantes de seqüestro do radical DPPH como sendo utilizado para a análise da capacidade antioxidante total de extratos vegetais e algas (WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; ZHAO et al., 2006; BARLA et al., 2007). Sendo assim utilizou-se este teste para avaliar a capacidade antioxidante total dos PS de *H. wrightii*. EPS apresentou capacidade de seqüestrar o radical DPPH de forma dose-dependente, chegando à atividade máxima em torno de 41% com 0,5 mg. Esta atividade se mostrou bastante elevada quando se compara com o efeito de extratos ricos em fucanas da alga *Scytosiphon lomentaria* que apresentaram uma atividade em torno de 50%, mas com 2,5 mg (KUDA et al., 2005) e mesmo quando se compara com a atividade de PS como os extraídos de *Porphyra haitanensis* que apresentaram uma atividade máxima de ~8% utilizando-se ~2,4 mg (ZHAO et al., 2006).

Antioxidantes capazes de quelar metais como o ferro II (Fe^{2+}) minimizam os riscos desses em catalizar a formação do radical livre hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio, o que resulta na proteção contra danos oxidativos (HUANG; MENDIS; KIM, 2005). Três frações ricas em fucanas extraídas de *Laminaria japônica* apresentaram atividade antioxidante máxima que variou entre 19 a 28%. Quanto maior a relação sulfato/fucose melhor a atividade da fração, o que indica uma forte relação entre a atividade quelante e o teor de sulfato (WANG et al., 2007). Nosso grupo mostrou que galactanas sulfatadas de *Gracilaria caudata* apresentaram maior atividade quanto maior à quantidade de galactose em relação aos seus demais resíduos de açúcar (SABRY et al., 2008). Apesar de EPS apresentar galactose e sulfato em sua composição, ele não apresentou atividade quelante de metal.

Entre as espécies reativas do metabolismo do oxigênio molecular (ERMOs) o radical hidroxila é o que causa mais danos às biomoléculas. Vários PS vêm

apresentando essa atividade, como K - carragenanas (ZHANG et al., 2003; 2004; SOUZA et. al., 2007), fucoidans (WANG et al., 2007), galactanas (SABRY et al., 2008). Contudo, como ocorreu com a quelação de metais, EPS não apresentou atividade seqüestradora de hidroxilas.

Dados na literatura indicam que a atividade de seqüestro do radical superóxido já foi descrita para polissacarídeos, inclusive sulfatados artificialmente, como foi observado quando se utilizou quitosana sulfatada que apresentou uma habilidade de seqüestro do radical de ~40% utilizando-se 0,025 mg/mL (XING et al., 2004). Percentual semelhante foi encontrado para quitosana deacetilada que teve uma habilidade de seqüestro de 41,37% com 0,02 mg/mL (PARK; JE; KIM, 2003). Tsiapali et al. (2001) demonstraram que glucanas quando fosforiladas ou sulfatadas quimicamente exibem atividade sequestradora do radical superóxido. Estes dados indicaram que polieletrólitos podem ser responsáveis pelo aumento da atividade de seqüestro. Polissacarídeos que já são sulfatados naturalmente também apresentam essa atividade, como fucoidans da alga *Laminaria japonica*, que apresentaram atividade em torno de 30 % utilizando-se ~ 0,023 mg/mL (WANG et al., 2007). Estes autores também relataram que os fucoidans mais ativos eram os que se apresentavam mais sulfatados. EPS apresentou uma atividade em torno de 35% com 0,005 mg/mL, que foi cerca de 6 vezes maior do que a apresentada pelo ácido gálico na mesma concentração, além disso esta concentração foi 5 vezes menor do que a utilizada por aquela quitosana sulfatada obtendo um percentual de seqüestro semelhante (~40%). Contudo, esta atividade não aumentou com o aumento da concentração de EPS. Embora o radical superóxido não seja considerado um radical altamente reativo estes resultados tornam-se interessantes por sugerirem a existência de um composto capaz de seqüestrar este radical que é o primeiro a ser formado na redução tetravalente do oxigênio molecular onde a partir dele são formadas outras ERMOs como os radicais hidroxilas considerados os mais danosos ao organismo.

O teste de poder redutor é também considerado um teste de atividade antioxidante na medida que avalia a capacidade que a amostra teste tem em doar elétrons contribuindo desta forma para estabilização das ERMOs. EPS apresentou uma atividade dose-dependente que estabilizou com 0,25 mg/mL com uma DO de

0,25 que correspondeu a 50% do poder redutor da vitamina C nesta mesma concentração. EPS foi mais potente do que extrato rico em PS da alga *Porphyra haitanensis*, que apresentou uma D. O. máxima em torno de 0,2 utilizando-se 0,6 mg/mL que foi mais do que o dobro da utilizada para EPS para obter uma D. O semelhante (~0,25) (ZHAO et al., 2006). EPS também se mostrou mais potente do que PS purificados, como fucoidans de *Laminaria japonica*, que apresentaram D.O. entre 0,079 e 0,106 na concentração de 1 mg/mL que foi 5 vezes maior do que a utilizada por EPS que apresentou uma D. O superior (~ 0,25) (WANG et al., 2007). Os nossos dados e aqueles encontrados na literatura sugerem que atividade antioxidante de PS não é meramente dependente de sulfato, mas também, de outros fatores, possivelmente, tamanho da molécula, tipo de monossacarídeos e ligação entre eles além da distribuição de seus substituintes, inclusive os grupos sulfato, pela molécula (HUANG; MENDIS; KIM, 2005; SOUZA et al., 2007)

Estudos futuros indicarão quais dessas e outras características estruturais serão importantes para PS apresentarem esta atividade, inclusive para aqueles encontrados em *H. wrightii*.

Os PS de *H. wrightii* não apresentaram atividade anticoagulante no teste de PT, o que mostra que eles não possuem ação sobre a via extrínseca da coagulação.

Testes de atividade anticoagulante de aPTT também foram realizados. Os resultados indicaram uma atividade dose dependente, sendo que com 20 µg da amostra se observou duplicação do tempo de coagulação para o teste de aPTT. Os dados sugerem que o EPS do capim do mar *H. wrightii* possuem atividade anticoagulante prolongando o tempo de coagulação por atuação e inibição apenas da via intrínseca e/ou da via comum da cascata de coagulação.

Sugere-se que a atividade anticoagulante observada por EPS é resultante da presença e localização de grupamentos sulfato. As análises de infravermelho mostraram sulfatação no C2. Estudos com PS anticoagulantes atribuem sulfatação em C3, C2 ou C4 como sendo importantes para se ter atividades anticoagulante altas (ROCHA et al., 2006). Estes resultados sugerem a existência de um composto com um grande potencial anticoagulante na medida em que a massa necessária para dobrar o tempo de coagulação é apenas duas vezes e meia maior do que a massa da heparina de baixo peso molecular (Clexane®) necessária para realizar o

mesmo efeito. Estudos posteriores fazem-se necessários para aprofundamento e melhor compreensão do mecanismo de ação de EPS.

6 - CONCLUSÕES

- *Halodule wrightii* é rico em polissacarídeos sulfatados que contém galactose, xilose, glicose com relações molares semelhantes;
- *Halodule wrightii* contém polissacarídeos sulfatados com uma massa molecular média de 11 kDa;
- Os Polissacarídeos sulfatados de *Halodule wrightii* estão localizados na epiderme da porção vegetativa raiz;
- EPS não apresentou atividade antioxidante para os ensaios CAT, seqüestro do radical hidroxila e atividade quelante de metal;
- EPS apresentou atividade antioxidante nos ensaios de seqüestro do radical DPPH, poder redutor e seqüestro do radical superóxido;
- EPS possui uma potente atividade anticoagulante, agindo na via intrínseca da coagulação;

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, I. R.; QUEIROZ, K. C.; ALVES, L. G.; SANTOS, E. A.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Braz J Med Biol Res.** 37: 167-171, 2004.
- ALVES, L. G. **Polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha *Sargassum vulgare***. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Natal-RN, 2000.
- AQUINO, R. S.; LANDEIRA-FERNANDES, A. M.; VALENTE, A. P.; ANDRADE, L. R.; MOURÃO, P. A. S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology.** 15: 11-20, 2005.
- ATHUKORALA, Y.; LEE, K. W.; KIM, S. K.; JEON, Y. J. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Biores Technol.** 98: 1711-1716, 2007.
- AZEVEDO, T. C. G.; BEZERRA, M. E. B.; SANTOS, M. G. L.; SOUZA, L. A.; MARQUES, C. T.; BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, E. L. Heparinoids algal and their anticoagulant, hemorrhagic activities and platelet aggregation. **Biomed Pharm.** 62: 1-7, 2008.
- AZZI, A.; DAVIES, K. J. A.; KELLY, F. Free radical biology-terminology and critical thinking. **Febs Letters.** 558: 3-6, 2004.
- BARLA, A.; ÖZTÜRK, M.; KÜLTÜR, S.; ÖKSÜZ, S. Screening of antioxidant activity of three Euphorbia species from Turkey. **Fitoterapia.** 78: 423 – 425, 2007.
- BARROSO, E. M. A.; COSTA, L. S.; MEDEIROS, V. P.; CORDEIRO, S. L.; COSTA, M. S. S. P.; FRANCO, C. R. C.; NADER, H. B.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. A non-anticoagulant heterofucans has antithrombotic activity in vivo. **Planta Medica.** 74: 712-718, 2008.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochemistry.** 44: 276-287, 1971.
- BEGUIN, S.; LINDHOUT, T.; HEMKER, H. C. The mode of action of heparin in plasma. **Thromb Haemost.** 22: 457-462, 1988.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; F. NETO, A. G. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. **Edart**, 1976.
- BEIJERING, R. J. R.; TENCATE, H.; TENCATE, J. W. Clinical applications of new antithrombotic agents. **Annals of Hematology.** 72: 177-183, 1996.
- BÈLTRAN, G. M.; AGUILERA, P.; RIO, C. D.; SANCHEZ, S.; MARTINEZ, L. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of hojiblanca virgin olive oils. **Food Chemistry.** 89: 207–215, 2005.

- BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F.; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C.; FISCHER, A. M.; AGOSTINI, A.; JOZEFONVICZ J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs Future**. 20: 1237-1249, 1995.
- BOUÇAS, R. I.; SAMPAIO, L. O.; ANDRADE, G. P. V.; LOPES, C. C.; NASCIMENTO, F. D.; TERSARIOL, I. L. S.; ROCHA, H. A. O.; NADER, H. B. Heparin and heparin derivatives and their effect on hemostasis. In: Verli, H.; GUIMARÃES, J. A. (Org.). Insights into **Carboh Struct and Biol Function**. Kerala: Transworld Research Network. v.: 25-50, 2006.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochemistry**. 72: 248-254, 1976.
- BRITO, A. S.; ARIMATÉIA, D. S.; SOUZA, L. R.; LIMA, M. A.; SANTOS, V. O.; MEDEIROS, V. P.; FERREIRA, P. A.; SILVA, R. A.; FERREIRA, C. V.; JUSTO, G. Z.; LEITE, E. L.; ANDRADE, G. P.; OLIVEIRA, F. W.; NADER, H. B.; CHAVANTE, S. F. Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp. **Bioorg Med Chem**. 16: 9588-9595, 2008.
- BUSH, C. A.; PASTOR, M. M.; IMBERTY, A. Structure and conformation of complex carbohydrates of glycoproteins, glycolipids and bacterial polysaccharides. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**. 28: 269-293, 1999.
- CADENAS, E.; DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Rad Biol and Med**. 29: 222-230, 2000.
- CARDOSO, M. L. **Efeito de frações obtidas da fucoídiana de *Fucus vesiculosus* em modelo experimental de artrite induzida por Zymosan** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Natal-RN, 2007.
- CHANDLER, S. F.; DODS, J. H. The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the non production of phenolics and solasidine in callus cultures of *Solanum lacinitum*. **Plant Cell**. 2: 105, 1983.
- CHEM, H. S.; CHEM, J. M.; LIN, C. W.; KHOO, K. H.; TSAI, I. H. New insights into the functions and N-glycan structures of factor X activator from Russell's viper venom. **FEBS J**. 275: 3944-58, 2008.
- CHEVOLOT, L.; FOUCAULT, A.; CHAUBET, F.; KERVAREC, N.; SINQUIN, C.; FISHER, A. M.; BOISSON-VIDAL, C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. **Carbohydr Res**. 319: 154-65, 1999.
- COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med**. 111: 918-31, 1989.

-
- COLLIEC, S.; FISCHER, A. M.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; BOISSON, C.; DURAND P.; JOZEFONVICZ, J. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. **Thrombosis Research**. 64: 143-154, 1991.
- COSTA, M. S. S. P.; COSTA, L. S.; CÂMARA, R. B. G.; NOBRE, L. T. D. B.; ROCHA, H. A. O. **Atividades antiproliferativa, antioxidante e anticoagulante de algas marinhas do litoral do Rio Grande do Norte**. In: 59º Congresso Nacional de Botânica; 4º Congresso da Sociedade Latino-americano de Cactaceae e outras Suculentas; 30º Congresso da Organização Internacional para o Estudo das Plantas Suculentas e 31ª Reunião Nordestina de Botânica, 2008, Natal-RN.
- COLWELL, N. S.; GRUPE, M.J.; TOLLEFSEN, D. M. Amino acid residues of heparin cofactor II required for stimulation of thrombin inhibition by sulphated polyanions. **Biochim Biophys Acta**. 12: 148-156, 1999.
- DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**. 145: 1310-1312, 1964.
- DECKER, E. A.; WELCH, B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. **J Agric Food Chem**. 38: 674-677, 1990.
- DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissue. Isolation and partial characterization of a homogeneous species of heparitin sulfate. **Biochim Biophys Acta**. 20: 34-44, 1974.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal Biochem**. 70: 645-647, 1976.
- DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; STRAUS, A. H. Structural differences of heparan sulfates according to tissue and species of origin. **Biochem Biophys Res Commun**. 111: 865-871, 1983.
- DIETRICH, C. P. A model of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz J Med Biol Res**. 17: 5-15, 1984.
- DIETRICH, C. P.; PAIVA, J. F. ; MORAES, C. T.; TAKAHASHI, H. K.; PORCIONATTO, M. A.; NADER, H. B. Isolation and characterization of a heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliensis*. **Biochim Biophys Acta**. 843: 1-7, 1985.
- DIETRICH, C. P.; TERSARIOL, I. L.; TOMA, L.; MORAES, C. T.; PORCIONATTO, M. A.; OLIVEIRA, F. W.; NADER, H. B. Structure of heparan sulfate: identification of variable and constant oligosaccharide domains in eight heparan sulfates of different origins. **Cell Mol Biol**. 44: 417-429, 1998.
- DIETRICH, C. P.; PAIVA, J. F.; CASTRO, R. A.; CHAVANTE, S. F.; JESKE, W.; FAREED, J.; GORIN, P. A.; MENDES, A.; NADER, H. B. Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. **Biochem Biophys Acta**. 1428: 273-283, 1999.

-
- DOCTOR, V. M.; LEWIS, D.; COLEMAN, M.; KEMP, M. T.; MARBLEY, E.; SAULS, V. Anticoagulant properties of semisynthetic polysaccharide sulfates. **Thrombosis Research**. 64: 413-425, 1991.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem J**. 84: 106-110, 1962.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Anal Chem**. 28: 350-356, 1956.
- DÜRIG, J.; BRUHN, T.; ZURBORN, K. H.; GUTENSOHN, K. BRUHN, H. D.; BÉRESS, L. Anticoagulant fucoidan fractions from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation in vitro. **Thromb Res**. 85: 479-91, 1997.
- EATON, J. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary . **J Lab Clin Med**. 118: 3-4, 1991.
- ESKO, J. D. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. **Curr Opin Cell Biol**. 3: 805-816, 1991.
- FARIAS, E. H C.; VITOR, H. P.; VALENTE, A. P.; NADER, H. B.; ROCHA, H. A. O.; MOURÃO, P. A. S. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum* . **Glycobiology** . 18: 250-259, 2008.
- FARIAS, E. H. C. **Homogalactanas sulfatadas da alga *Codium isthmocladum* com atividade anticoagulante**. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Natal-RN, 2006.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**. 43: 61-68, 1997.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. **Nature**. 408: 239-247, 2000.
- FRANCO, R. F. **Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Simpósio: hemostasia e trombose**. Ribeirão Preto. Cap 1. 34: 229-237, 2001.
- GAHMBERG, C. G.; TOLVANEN, M. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. **Trends Biochem Sci**. 21: 308-311, 1996.
- GIRAUX, J. L.; TAPON-BRETAUDIÈRE, J.; MATOU, S.; FISCHER, A. M. Fucoidan, as heparin, induces tissue factor pathway inhibitor release from cultured human endothelial cells. **Thromb Haemost**. 80: 692-5, 1998.
- GRICE, H. C. Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. **Food and Chem Toxicol**. 26: 717-723, 1988.

-
- GRUMET, M.; FRIENDLAND, D. R.; SAKURAI, T. Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during development: interactions with adhesion molecules. **Perspect Dev Neurobiol.** 3: 319 - 330, 1996.
- HALLIWELL, B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? **Free Radic Biol Med.** 32: 968-74, 2002a.
- HALLIWELL, B. Vitamin E and the treatment and prevention of diabetes: a case for a controlled clinical trial. **Singapore Med J.** 43: 479-84, 2002b.
- HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology.** 141: 312-322, 2006a.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry.** 97: 1634-1658, 2006b.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans.** 35: 1147-50, 2007a.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochem J.** 401: 1-11, 2007b.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys** 246: 501-14, 1986.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.** 186: 1-85, 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. 4 ed. **Clarendon Press:** Oxford, 2006.
- HAN, F.; YAO, W.; YANG, X.; LIU, X.; GAO, X. Experimental study on anticoagulant and antiplatelet aggregation activity of a chemically sulfated marine polysaccharide YCP. **Intern J of Biol Macromol.** 36: 201-207, 2005.
- HARADA, N.; MAEDA, M. Chemical structure of antithrombin-active rhamnan sulfate from *Monostrom nitidum*. **Biosci Biotechnol Biochem.** 62: 1647-52, 1998.
- HAROUN-BOUHEDJA, F.; ELLOUALI, M.; SINGUIN, C.; BOISSON-VIDAL, C. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. **Thromb Res.** 100: 453-9, 2000.
- HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAWA, N. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Biochim Biophys Acta.** 1543: 86-94, 2000.

-
- HEO, S. J.; PARK, P. J.; PARK E. J.; KIM S. K.; JEON Y. J. Antioxidant activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Ecklonia cava* by electron spin resonance spectrometry and comet assay. **Eur Food Res Technol.** 221: 41-47, 2005.
- HILBORN, J. C.; ANASTASSIADIS, P. A. Estimation of the molecular weights of acidic mucopolysaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis. **Anal Biochem.** 39: 88-92, 1971.
- HIRSH, J. Oral Anticoagulants. **Chest** 105: 1903-1903, 1994.
- HOFFMAN, M.; MONROE, D. M.; OLIVER, J. A.; ROBERTS H. R. Factor IXa and factor Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. **Blood.** 86: 1794-801, 1995.
- HU, Y.; XU, J.; HU, Q. H. Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera aloe. barbadensis* Miller extracts. **J of Agric and Food Chem.** 51: 7788-7791, 2003.
- HUANG, R.; MENDIS, E.; KIM, S. K. Factors affecting the free radical scavenging behavior of chitosan sulfate. **Intern J of Biol Macromol.** 36: 120-127, 2005.
- IOZZO, R. V. Matriz proteoglycans from molecular design to cellular function. **Annu Rev Biochem.** 67: 609-652, 1998.
- JACKSON, R. L.; BUSCH, S. J.; CARDIN, A. D. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiol Rev.** 71: 481-539, 1991.
- JIANG, Y. H.; JIANG, X. L.; WANG, P.; HU, X. K. In vitro antioxidant activities of water-soluble polysaccharides extracted from *Isaria farinosa* B05. **J of Food Biochemistry.** 29: 323-335, 2005.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** 1.ed. São Paulo: Santos, 1983.
- KAKKAR, V. V.; STRINGER, M. D.; HEDGES, A. R.; PARKER, C. J.; WELZEL, D.; WARD, V. P.; SANDERSON, R. M.; COOPER, D.; KAKKAR, S. Fixed combinations of low-molecular weight or unfractionated heparin plus dihydroergotamine in the prevention of postoperative deep-vein thrombosis. **American J of Surgery** 157: 413-418, 1989.
- KINSELLA, J. E.; FRANKEL, E.; GERMAN, B.; KANNER, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidant in wine and plant foods. **Food Technology.** 4: 85-89, 1993.
- KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of cell wall of marine algae and ecophysiological function of matrix polysaccharides. **Oceanogr Mar Biol Ann Ver.** 26: 259-315, 1988.

- KUDA, T.; TSUNEKAWA, M.; HISHI, T.; ARAKI, Y. Antioxidant properties of dried ayamonori, a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). **Food Chemistry**. 89: 617–622, 2005.
- KUZNETSOVA, T. A.; BESEDNOVA, N. N.; MAMAEV, A. N.; MOMOT, A. P.; SHEVCHENKO, N. M.; ZVYAGINTSEVA, T. N. Anticoagulant activity of fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* of the Okhotsk Sea. **Bull Exp Biol Med**. 136: 471-3, 2003.
- LAHAYE, M. Developments on gelling algalgalactans, their structure and physico-chemistry. **J of Appl Phycology**. 13: 173-184, 2001.
- LEE, J. B., YAMAGAKI, T., MAEDA, M., NAKANISHI, H. Rhamnan sulfate from cell walls of *Monostroma latissimum*. **Phytochemistry**. 48: 921-925, 1998.
- LEE, J. B.; HAYASHI, K.; MAEDA, M.; HAYASHI, T. Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae. **Planta Med**. 70: 813-817, 2004.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006.
- LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVA, L. F.; CHAVANTE, S. F.; ABREU, L. D.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schroederi*. **Plant Science**. 132: 215-228, 1998.
- MacFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**. 202: 498-499, 1964.
- MAEDA, M.; UEHARA, T.; HARADA, N.; SEKIGUCHI, M.; HIRAOKA, A. Heparinoid active sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their distribution in the Chlorophyta. **Phytochemistry**. 30: 3611-3614, 1991.
- MARQUES, C. T. **Atividade antiinflamatória de uma heterofucana da alga marrom *Padina gymnospora***. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Natal-RN, 2007.
- MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. An anticoagulant proteoglycan from the marine green alga, *Codium pugniformis*. **J of Appl Phycology**. 12: 9-14, 2000.
- MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M. L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga *Codium cylindricum*. **Intern J of Biol Macromol**. 28: 395-399, 2001.
- MATSUBARA, K. Recent advances in marine algal anticoagulants. **Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents**. 2: 13-9, 2004.

- MAYO, J. C.; TAN, D. X.; SAINZ, R. M.; NATARAJAN, M.; LOPEZ-BURILLO, S.; REITER, R. J. Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxyl radicals: Comparative effects of melatonin and other antioxidants. **BBA-General Subjects**. 1620: 139–150, 2003.
- MEDEIROS, G. F.; MENDES, A.; CASTRO, R. A. B.; BAÚ, E. C.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochem Bioph Acta**. 1475: 1-8, 2000.
- 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**. 73: 1018-1024, 2008.
- MELO, F. R.; PEREIRA, M. S.; FOGUEL, D.; MOURAO, P. A. S. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides - Different mechanisms for heparin and sulfated galactans. **J of Biol Chem**. 279: 20824-20835, 2004.
- MILLET, J.; JOUAULT, S. C.; MAURAY, S.; THEVENIAUX, J.; STERNBERG, C.; BOISSON-VIDAL, C.; FISCHER, A. M. Antithrombotic and anticoagulant activities of a low molecular weight fucoidan by the subcutaneous route. **Thromb Haemost**. 81: 391-5, 1999.
- MOORE, J.; YIN, J. J.; YU, L. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical scavenging capacity (HOSC) estimation. **J Agric Food Chem**. 54: 617-26, 2006.
- MOURA, C. P. **Avaliação do potencial anti-inflamatório, anticoagulante e hemorrágico de heparinóides presentes em *Artemia franciscana***. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Natal-RN, 2004.
- MOURAO, P. A. S. A carbohydrate-based mechanism of species recognition in sea urchin fertilization. **Braz J Med Biol**. 40: 5-17, 2007.
- NADANAKA, S.; CLEMENT, A.; MASAYAMA, K.; FAISSNER, A.; SUGAHARA, K. Characteristic hexasaccharide sequences in octasaccharides derived from shark cartilage chondroitin sulfate D with a neurite outgrowth promoting activity. **J Biol Chem**. 273: 3296-3307, 1998.
- NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K. Physico-chemical characteristics of heparin in relation to its anticoagulant and anti-hemostatic action. **Rev Bras Biol**. 39: 793-816, 1979.
- NADER, H. B. Characterization of a heparan sulfate and peculiar chondroitin 4-sulfate from platelets. **J Biol Chem**. 266: 10518-10523, 1991.
- NADER, H. B.; KOBAYASHI, E. Y.; CHAVANTE, S. F.; TERSARIOL, I. L. S.; CASTRO, R. A. B.; SHINJO, S. K.; NAGGI, A.; TORRI, G.; CASU, B.; DIETRICH, C.

- P. New insights on the specificity of heparin and heparan sulfate lyases from *Flavobacterium heparinum* revealed by the use of synthetic derivatives of K5 polysaccharide from *E. coli* and 2-o-desulfated heparin. **J Glycoconjugate**. 16: 265-70, 1999.
- NADER, H. B.; LOPES, C. C.; ROCHA, H. A. O.; SANTOS, E. A.; DIETRICH, C. P. Heparins and Heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Current Pharm Design**. 10: 951-966, 2004.
- NAKAGAWA, T.; YOKOZAWA, T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. **Food and Chem Toxicol**. 40 : 1745–1750, 2002.
- NANDITA, S.; RAJINI, P. S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. **Food Chemistry**. 85: 611-616, 2004.
- NISHINO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; NAGUMO, T. An Anticoagulant fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia Kurome*. **Phytochemistry**. 30: 535-539, 1991.
- NISHINO, T.; FUKUDA, A.; NAGUMO, T.; FUJIHARA, M.; KAJI, E. Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Thrombosis Research**. 96: 37-49, 1999.
- NUNES, E.; OLIVEIRA, S. C.; MORAIS, R. N. Radicais livres: conceito, doenças, estresse oxidativo e antioxidantes. **Open Journal Systems**. 1: 01-32, 2006.
- OHASHI, M.; IDE, S.; SAWAGUCHI, A.; SUGANUMA, T.; KIMITSUKI, T.; KOMUNE, S. Histochemical localization of the extracellular matrix components in the annular ligament of rat stapediovestibular joint with special reference to fibrillin, 36-kDa microfibril-associated glycoprotein (MAGP-36), and hyaluronic acid. **Med Mol Morphol**. 41: 28-33, 2008.
- PADILHA, A. D. G. **Antioxidante natural de erva mate na conservação da carne de frango *in vivo***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria-UFSM. Santa Maria-RS, 2007.
- PARK, P. J.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. **Carboh Polymers**. 55: 17-22, 2004.
- PAVÃO, M. S. G.; MOURAO, P. A. S.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M. A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from ascidian - Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity. **J of Biol Chem**. 270: 31027-31036, 1995.
- PERCIVAL, E. G. V.; MACDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. London: **Academic Press**. 219, 1967.

- PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MELO, M. R. S.; VALENTE, A. P., MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carboh Research**. 340: 2015-2023, 2005.
- PIETRO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitative of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem**. 269: 337-341, 1999.
- QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; CHEN, R.; ZHANG, H.; NIU, X.; LI, Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. **Intern J of Biol Macromol**. 37: 195-199, 2005.
- RAMARAHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in Food Science and Technology**. 6: 75-82, 1995.
- ROCHA, H. A. O. **Extração e purificação de uma fucana da alga marinha *Spatoglossum schröderi***. Dissertação de Mestrado em Bioquímica - Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. São Paulo - SP, 1998.
- ROCHA, H.A.O.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S.; CARVALHO, L.C.M.; VEIGA, S.S.; LEITE, E.L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* inhibits chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Braz J Med. Biol.**, 34, 621- 6. 2001.
- ROCHA, H.A.O. **Caracterização de uma fucana da alga *Spatoglossum schröderi* e análise de suas atividades anti-adesiva, antimigratória, antiproliferativa e antitrombótica**. Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. São Paulo – SP, 2002.
- ROCHA, H. A. O.; MORAES, F. A.; TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R. C., TORQUATO, R. J. S.; VEIGA, S. S.; VALENTE, A. P.; MOURÃO, P. A. S.; LEITE, A. L.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Structural and haemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schröderi*. An ideal antithrombotic agent? **J Biol Chem**. 280: 41278-41288, 2005 (a).
- ROCHA, H.A.O.; BEZERRA, L.C.; ALBUQUERQUE, I.R.L.; COSTA, LS.; GUERRA, C.M.; ABREU, L.D.; NADER, H.B.; LEITE, E.L. A xylogalactofucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* stimulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial. **Planta Med**. 71: 379-81, 2005. (b).
- ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L.; MEDEIROS, V. P.; LOPES, C. C.; NASCIMENTO, F. D.; TERSARIOL, I. L. S.; SAMPAIO, L. O.; NADER, H. B. Natural sulfated polysaccharides as antithrombotic compounds. Structural characteristics and effects on the coagulation cascade. In: Verli, H; Guimarães, J. A.. (Org.). Insights into **Carboh Struct and Biol Function**. Kerala: Transworld Research Network. v.: 51-67, 2006.

- ROSEMAN, S. Reflections on glycobiology. **J Biol Chem.** 276: 4152-4154 , 2001.
- ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. **Membrane lipid oxidation.** CRC. Press: 151-70, 1991.
- SABRY, D. A.; COSTA, L. S.; CORDEIRO, S. L.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. **Atividade antioxidante de polissacarídeos extraídos da rodophyta *Gracilaria caudata*** J. AGARDH. In: 59º Congresso Nacional de Botânica; 4º Congresso da Sociedade Latino-americano de Cactaceae e outras Suculentas; 30º Congresso da Organização Internacional para o Estudo das Plantas Suculentas e 31ª Reunião Nordestina de Botânica, 2008, Natal-RN.
- SALDANHA, L. A. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*).** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública - USP/FSP. São Paulo - SP, 2005.
- SANTOS, N. D. **Identificação e caracterização química das frações ricas em polissacarídeos sulfatados extraídos de macrofitas dulcícolas.** Dissertação-Mestrado-Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Natal-RN, 2007.
- SANTOS, V. O. **Polissacarídeos sulfatados de interesse farmacológico no camarão *Litopenaeus schimitti*.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Natal-RN, 2006.
- SAULS, D. L.; WOLBERG, A. S.; HOFFMAN, M. Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia. **J Thromb Haemost.** 1: 300-306, 2003.
- SHIOI, J.; ANDERSON, J. P.; RIPPELINO, J. A.; ROBAKIS, N. K. Chondroitin sulfate proteoglycan form of the Alzheimer's β -amyloid precursor. **J Biol Chem.** 267: 13819 - 13822, 1992.
- SILVA, F. R. F. **Estudo Comparativo de Carragenanas Comerciais Kappa, Iota e Lambda no processo inflamatório em ratos: edema intraplantar e pleurisia.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Natal-RN, 2005.
- SILVA, T. M.; ALVES, L. G.; QUEIROZ, K. C.; SANTOS, M. G.; MARQUES, C. T.; CHAVANTE, S. F.; ROCHA, H. A.; LEITE, E. L. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Braz J Med Biol Res.** 38: 523-33, 2005.
- SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry.** 28:1057-1060,1989.

- SORIANO, E. M.; FONSECA, P. C.; CARNEIRO, M. A. A.; MOREIRA, W. S. C. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. **Bioresource Technology**. 97: 2402-2406, 2006.
- SOUZA, M. C. R.; MARQUES, C. T.; DORE, C. M. G.; SILVA, F. R. F.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L.. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **J Appl Phycol**. 19: 153-160, 2007.
- SPRINGER, G. F.; WURZEL, H.A.; MCNEAL, G. M. J.; ANSELL, N. J.; DOUGHTY M. F. Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin. **Proc Soc Exp Biol Med**. 94: 404-9, 1957.
- SUGAHARA, K.; KITAGAWA, H. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. **Current Opinion in Structural Biology**. 10: 518-527, 2000.
- SUN, C.; WANG, J. W.; FANG, L.; GAO, X. D.; TAN, R. X. Free radical scavenging and antioxidant activities of EPS 2, an exopolysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Keissleriella* sp YS 4108. **Life Science**. 75: 1063-1073, 2004.
- TOIDA, T.; CHAIDEDGUMJORN, A.; LINHARDT, R. Structure and bioactivity of sulfated polysaccharides **J Trends Glycosc. Glycotecnol**. 15: 29-46, 2003.
- TOIDA, T.; SAKAI, S.; AKIYAMA, H.; LINHARDT, R. J. Immunological activity of chondroitin sulfate. **Adv Pharmacol**. 53: 403-415, 2006.
- TRENTO, F.; CATTANEO, F.; PESCADOR, R.; PORTA, R.; FERRO, L. Antithrombin activity of an algal polysaccharide. **Thromb Res**. 102: 457-65, 2001.
- TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**. 166: 444 - 445, 1950.
- TSIAPALI, E.; WHALEY, S.; KALBFLEISCH, J.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, I. W.; WILLIAMS, D. L. Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. **Free Radic Biol Med**. 15: 393-402, 2001.
- UCHIDA, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. **Free Rad Biol Med**. 28: 1685-1696, 2000.
- USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**. 12: 301-308, 1998.
- VAN DE VELDE, F.; PEREIRA, L.; ROLLEMA, H. S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydrate Research**. 339: 2309-2313, 2004.
- VEENA, C. K.; JOSEPHINE, A, PREETHA, S. P.; VARALAKSHMI, P.; SUNDARAPANDIYAN, R. Renal peroxidative changes mediated by oxalate: the protective role of fucoidan. **Life Sci**. 79: 1789-95, 2006.

-
- VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. **Biochim Biophys Acta**. 257: 11-19, 1972.
- VOLK, R. B.; VENZKE, K.; BLASCHEK, W.; ALBAN, S. Complement Modulating and Anticoagulant Effects of a Sulfated Exopolysaccharide Released by the Cyanobacterium *Synechocystis aquatilis*. **Planta Med.** 72: 1424-1427, 2006.
- VOLPI, N.; MACCARI, F. Electrophoretic approaches to the analysis of complex polysaccharides. **J Chromatography B**. 834: 1-13, 2006.
- WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; LI, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **Intern J of Biol Macromol**. 42: 127-132, 2007.
- WANG, Z.; LUO, D. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from *Gynostemma pentaphyllum* Makino. **Carboh Polymers**. 68: 54-58, 2007.
- WILLIAMS-BRAND, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm W U Technol**. 28: 25 - 30, 1995.
- XAVIER, C. A. C. **Efeito do Fucoidam de *Fucus vesiculosus* em um modelo experimental de artrite reumatóide**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN. Natal-RN, 2005.
- XING, R.; LIU, S.; YU, H.; ZHANG, Q.; LI, Z.; LI, P. Preparation of low-molecular-weight and high-sulfate-content chitosans under microwave radiation and their potential antioxidant activity in vitro. **Carboh Research**. 339: 2515 - 9, 2004.
- YAN, X.; XIANCUI, L.; CHENGXU, Z.; XIAO, F. Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*. **J Appl Phycol** 8: 201-203, 1996.
- YAN, X.; CHUDA, Y.; SUZUKI, M.; NAGATA, T. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. **Biosci Biotech Bioch**. 63: 605 - 607, 1999.
- YANG, J. H.; DU, Y. M.; HUANG, R. H.; AN, Y. Y.; WEN, Y. The structure anticoagulant activity relationships of sulfated lacquer polysaccharide: effect of carboxyl group and position of sulfation. **Intern J of Biol Macromol**. 36: 9-15, 2005.
- YEN, G. C.; CHEN, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **J Agric Food Chem**. 43: 27-32, 1995.
- YOON, S. J.; PYUN, Y. R.; HWANG, J. K.; MOURÃO, P. A. A sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* has mainly heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. **Carboh Research**. 342: 2326-2330, 2007.

YUAN, H.; ZHANG, W.; LI, X.; LU, X.; LI, N.; GAO X.; SONG, J. Preparation and in vitro antioxidant activity of k-carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated and phosphorylated derivatives. **Carboh Research**. 340: 685-692, 2005.

YUAN, Y. V.; WALSH, N. A. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. **Food and Chem Toxicol**. 44, 1144-1150, 2006.

ZHANG, Q.; YU, P.; LI, Z.; ZHANG, H.; XU, Z.; LI, P. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanensis*. **J of Applied Phycology**. 15: 305–310, 2003.

ZHANG, Q.; LI, N.; LIU, X.; ZHAO, Z.; LI, Z.; XU, Z. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity. **Carboh Research**. 339: 105-111, 2004.

ZHAO, T.; ZHANG, Q.; QI, H.; ZHANG, H.; NIU, X.; XU, Z.; LI, Z. Degradation of porphyran from *Porphyra haitanensis* and the antioxidant activities of the degraded porphyrans with different molecular weight. **Inter J of Biol Macromol**. 38: 45-50, 2006.

ZHU, X.; RAINA, A. K.; LEE, H. G.; CASADESUS, G.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. **Brain Research**. 1000: 32- 39, 2004.