



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

**Leandro Silva Costa**

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS  
SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA VERMELHA *Gracilaria  
caudata***

**NATAL  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LEANDRO SILVA COSTA**

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS  
SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA VERMELHA  
*GRACILARIA CAUDATA***

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**

Dedico esta obra

A minha família, pelo amor incondicional a mim oferecido, bem como, todo o apoio durante minha vida acadêmica. Sem a ajuda de vocês nunca aconteceria este momento tão importante em minha vida.

Dedico esta obra

À minha noiva Janielle, por sempre estar ao meu lado nos momentos mais importantes da minha vida me ajudando a conquistar meus maiores sonhos.

Dedico esta obra

Ao meu orientador Hugo, pela dedicação, paciência e cumplicidade durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sua existência.

Aos meus pais, por sempre estarem presentes e compartilharem comigo todos os momentos, desde os mais difíceis aos mais fáceis de minha vida.

Ao meu eterno amor Janielle, por me completar e me fazer a pessoa mais feliz do mundo. Obrigado pela sua amizade, respeito e amor, e principalmente, por fazer parte da minha vida.

Ao meu irmão, minha cunhada Carla e meu sobrinho/afilhado Cauã, que apesar da distancia, sempre torcem muito por mim. Vocês sempre terão um lugar especial em meu coração

Aos vários amigos que fiz em minha vida, em especial aqueles que tenho como irmãos: Jean, Wallace e Erio.

Aos amigos da velha guarda do laboratório, que foram responsáveis pelos meus primeiros e talvez os mais importantes conhecimentos científicos: Ivan, Cybelle e Duda

Aos amigos do BIOPOL: Sara, Mariana, Diego (Popó), Nednaldo, Rafael, Leonardo, Cinthia, Railson, Dayanne, Ruth, Raniere, Gabriel, Arthur, Ana Karine, Sayonara, Érika, Edjane...

Aos amigos de turma de mestrado, Jailma, Ligia, Cleysivan, Sheyla e Katrine pelo companheirismo, principalmente nos seis primeiros meses bacanas, porém complicados

Aos vários amigos de departamento, pelos diversos momentos divertidos nos corredores da Bioquímica.

Aos professores do Departamento de Bioquímica pelos conhecimentos passados e por sempre depositarem enorme confiança em meu trabalho.

A professora Edda, a qual eu nutro um carinho muito especial, pelos seus valiosos ensinamentos de vida.

À CAPES e CNPq, pelo financiamento que permitiu a conclusão deste trabalho.

Ao meu chefe orientador Hugo, por todos os ensinamentos passados durante meus seis anos de laboratório.



## RESUMO

Nos últimos anos, os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas têm emergido como uma importante classe de biopolímeros naturais com potenciais aplicações farmacológicas. Dentre estas, os polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas tem sido extensivamente estudados, principalmente devido seu potencial anticoagulante, antitrombótico e antiinflamatório. Neste estudo, três frações de polissacarídeos sulfatados, denominadas F1,5v, F2,0v e F3,0v, foram extraídas da alga vermelha *Gracilaria caudata*, através de proteólise, seguida de fracionamento com acetona. Eletroforese em gel de agarose em Tampão PDA mostrou a presença de polissacarídeos sulfatados em todas as frações. As análises químicas demonstraram que todas as frações são compostas principalmente de galactose. Esses compostos foram testados para as atividades anticoagulante, antioxidante e antiproliferativa. Na atividade anticoagulante avaliada através de kits comerciais de aPTT e PT, nenhuma das frações apresentou atividade nas concentrações testadas (0,1; 0,5 e 1,0 mg/mL). A atividade antioxidante das frações polissacarídicas foi avaliada através de diversos ensaios *in vitro*: Capacidade antioxidante total, seqüestro de radical superóxido e hidroxila, quelação férrica e poder redutor. As frações apresentaram diferentes níveis de atividade antioxidante nos sistemas testados. A fração F1,5v apresentou a maior atividade antioxidante, principalmente no ensaio de quelação férrica, com cerca de 70,00% de inibição na concentração de 1,0 mg/mL. Finalmente, todas as frações apresentaram atividade antiproliferativa dose-dependente frente a linhagem celular tumoral HeLa. As frações F1,5v e F2,0v apresentaram as maiores atividades antiproliferativa na concentração de 2,0 mg/mL, com 42,70% e 37,00% de inibição da proliferação celular em relação ao controle. Nossos resultados sugerem que os polissacarídeos sulfatados de *G. caudata* são promissores fármacos na terapia antioxidante e/ou antiproliferativa.

Palavras chave: *Gracilaria caudata*; Atividade anticoagulante; Atividade antioxidante; Atividade antiproliferativa; Radicais livres;

## ABSTRACT

In recent years, sulfated polysaccharides (SP) from marine algae have emerged as an important class of natural biopolymers with potential pharmacology applications. Among these, SP isolated from the cell walls of red algae have been study due to their anticoagulant, antithrombotic and anti-inflammatory activities. In the present study, three sulfated polysaccharides fractions denominated F1.5v, F2.0v and F3.0v were obtained from seaweed *G. caudata* by proteolysis followed to acetone fractionation. Gel electrophoresis using 0.05 M 1,3-diaminopropane-acetate buffer, pH 9,0, stained with 0.1% toluidine blue, showed the presence of SP in all fractions. The chemical analysis demonstrated that all the fractions are composed mainly of galactose. These compounds were evaluated in anticoagulant, antioxidant and antiproliferative activities. In anticoagulant activity evaluated through aPTT and PT tests, no one fractions presented anticoagulant activity at tested concentrations (0.1 mg/mL; 1.0 mg/mL; 2.0 mg/mL).The antioxidant activities of the three fractions were evaluated by the following in vitro systems: Total antioxidant capacity, superoxide and hydroxyl radical scavenging, ferrous chelating activity and reducing power. The fractions were found to have different levels of antioxidant activity in the systems tested. F1.5v shows the highest activity, especially in the ferrous chelating system, with 70% of ferrous inhibiting at 1.0 mg.mL<sup>-1</sup>. Finally, all the fractions showed dose-dependent antiproliferative activity against HeLa cells. The fractions F1.5v and F2.0v presented the highest antiproliferative activity at 2.0 mg/mL with 42.7% and 37.0% of inhibition, respectively. Ours results suggests that the sulfated polysaccharides from seaweed *G. caudata* are promising compounds in antioxidant and/or antitumor therapy.

Keywords: *Gracilaria caudata*; Red Algae; Anticoagulant; Antioxidant; Antiproliferative; Free radicals.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Disfunções associadas aos radicais livres.....	26
Figura 02	Alga marinha vermelha <i>Gracilaria caudata</i> estudada neste trabalho.....	30
Figura 03	Metodologia de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga <i>Gracilaria caudata</i> .....	33
Figura 04	Rendimento percentual das frações obtidas por precipitação com acetona, da alga marinha <i>G. caudata</i> .....	38
Figura 05	Comportamento eletroforético das frações cetônicas da alga <i>Gracilaria caudata</i> .....	39
Figura 06	Cromatografia descendente em papel dos hidrolisados das frações polissacarídicas da alga <i>G. caudata</i> .....	41
Figura 07	Capacidade antioxidante total dos polissacarídeos sulfatados de <i>G. caudata</i> .....	44
Figura 08	Atividade inibitória dos radicais superóxido pelos polissacarídeos sulfatados de <i>G. caudata</i> .....	45
Figura 09	Atividade inibitória dos radicais hidroxilas pelos polissacarídeos sulfatados de <i>G. caudata</i> .....	46

Figura 10 Atividade de Quelação férrica dos polissacarídeos sulfatados de <i>G. caudata</i> .....	47
Figura 11 Ensaio de poder redutor.....	49
Figura 12 Atividade antiproliferativa dos polissacarídeos sulfatados da alga <i>G. caudata</i> .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela I	Principais características utilizadas para classificação das algas marinhas.....	18
Tabela II	Algumas das atividades farmacológicas atribuídas as fucanas.....	20
Tabela III	Atividades farmacológicas atribuídas aos polissacarídeos sulfatados de algas verdes.....	22
Tabela IV	Composição química parcial dos polissacarídeos sulfatados obtidos da alga <i>G.caudata</i> .....	40
Tabela V	Relação molar dos polissacarídeos sulfatados da alga <i>G. caudata</i> .....	42
Tabela VI	Atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga <i>G. caudata</i> .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

<b>ÁC. GLU</b>	Ácido glucurônico
<b>aPTT</b>	Tempo de tromboplastina parcial ativada
<b>ARA</b>	Arabinose
<b>AT</b>	Antitrombina
<b>CAT</b>	Capacidade antioxidante total
<b>CTV</b>	Brometo de cetiltrimetilamônio
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>F1,5v</b>	Fração precipitada com 1,5 volumes de acetona
<b>F2,0v</b>	Fração precipitada com 2,0 volumes de acetona
<b>F 3,0v</b>	Fração precipitada com 3,0 volumes de acetona
<b>FUC</b>	Fucose
<b>GAL</b>	Galactose
<b>GLI</b>	Glicose
<b>HCII</b>	Cofator II da heparina
<b>HEP</b>	Heparina não-fracionada
<b>MAN</b>	Manose
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-y1)2,5-diphenil tetrazolium bromide)
<b>NBT</b>	Nitroblue tetrazolium
<b>PT</b>	Tempo de Tromboplastina
<b>RAF</b>	Rafinose
<b>RHA</b>	Rhamnose
<b>RPM</b>	Rotações por minuto

<b>TCA</b>	Ácido Tricloroacético
<b>TT</b>	Tempo de trombina
<b>v/v</b>	Volume/Volume
<b>XIL</b>	Xilose

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	18
1.1.	ALGAS MARINHAS	18
1.2.	POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS.	19
1.3.	ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS	23
1.4.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS	26
1.5.	ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS	27
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	30
2.1	MATERIAL BIOLÓGICO	30
2.2	OUTROS MATERIAIS	31
<b>2.2.1</b>	<b>Reagentes</b>	31
<b>2.2.2</b>	<b>Padrões</b>	31
<b>2.2.3</b>	<b>Aparelhos</b>	31
<b>2.2.4</b>	<b>Plasma Humano</b>	32
<b>2.2.5.</b>	<b>Células tumorais</b>	32
2.3	OBTENÇÃO DO “PÓ CETÔNICO”	32
2.4	OBTENÇÃO DO “CRU DE POLISSACARÍDEOS (PROTEÓLISE)	32
2.5	FRACIONAMENTO COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ACETONA	33
2.6	– ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	34



2.7	ANÁLISES QUÍMICAS	34
2.7.1	DOSAGEM DE AÇÚCARES TOTAIS	34
2.7.2	DOSAGEM DE SULFATO	34
2.7.3	DOSAGEM DE PROTEÍNAS	34
2.8	ATIVIDADE ANTICOAGULANTE	35
2.9.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	35
<b>2.9.1.</b>	<b>Atividade antioxidante total</b>	35
<b>2.9.2.</b>	<b>Seqüestro de radicais hidroxilas</b>	35
<b>2.9.3.</b>	<b>Sequestro de radicais superóxido</b>	36
<b>2.9.4.</b>	<b>Quelação férrica</b>	36
<b>2.9.5.</b>	<b>Poder redutor</b>	36
2.10.	ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	37
2.11.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b>	38
3.1.	FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA <i>GRACILARIA CAUDATA</i>	38
3.2.	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA <i>G. CAUDATA</i>	38
3.3.	ANÁLISES QUÍMICAS DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA <i>G. CAUDATA</i>	39
3.4.	CROMATOGRAFIA EM PAPEL DESCENDENTE DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA <i>G. CAUDATA</i>	40
3.5.	ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA <i>G. CAUDATA</i> .	43

3.6. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS EXTRAÍDOS DA ALGA <i>G. CAUDATA</i>	44
<b>3.6.1. Ensaio de Capacidade antioxidante total (CAT)</b>	44
<b>3.6.2. Ensaio de seqüestro de radicais superóxido</b>	45
<b>3.6.3. Ensaio de seqüestro de radicais hidroxilas</b>	46
<b>3.6.4. Ensaio de Quelação férrica</b>	47
<b>3.6.5. Ensaio de Poder redutor</b>	48
3.7. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA <i>G. CAUDATA</i>	49
<b>4 DISCUSSÃO</b>	51
<b>5 CONCLUSÕES</b>	57
<b>REFERÊNCIAS</b>	58

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1- Algas marinhas

As macroalgas marinhas são um grupo de seres vivos aquáticos e autotróficos que apresentam a clorofila *a* como principal pigmento fotossintético, além da presença de outros pigmentos acessórios, que são características importantes na classificação desse grupo. Muitos autores, devido a algumas características morfofisiológicas, classificam as algas marinhas não mais como vegetais, mas como protistas. Elas são divididas em três grupos: *Phaeophyceae* ou algas marrons, que apresentam o pigmento fucoxantina em sua constituição, que é responsável pela sua coloração característica; *Rhodophyceae* ou algas vermelhas, que contêm ficoeritrina e *Chlorophyceae* ou algas verdes que se mostram constituídos principalmente por clorofilas *a* e *b*. A tabela I sumariza os critérios de classificação utilizados e suas características.

Tabela I: Principais características utilizadas para classificação das macroalgas

Ordem	Tipo de clorofila	Outros pigmentos	Substâncias de reservas	Constituição da parede celular
Chlorophyta	a, b	Carotenos	Amido	Celulose, pectinas
Phaeophyta	a, c	Luteína e fucoxantina	Laminarina e manitol	Celulose, alginato
Rhodophyta	a, d	Carotenos, xantofilas, ficocianina e ficoeritrina	Amido das florideas	Celulose, pectinas

Fonte: Adaptado de ORIANIS *et al.*, 1999

As algas marinhas apresentam um alto valor nutritivo, sendo ricas em carotenóides, proteínas, fibras dietéticas, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais. São utilizadas como fonte de alimentos principalmente nos países

asiáticos, chegando a constituir cerca de 25% da dieta humana em países como Japão, China e Coréia do Sul (MCHUGH, 2003).

Além de sua utilização no setor alimentício, as algas produzem uma gama de substâncias utilizadas comercialmente como: alginatos, que são polímeros constituídos de monossacarídeos ácidos (ácido gulurônico e ácido manurônico), de caráter viscoso, produzidos por certas espécies de algas pardas. Eles são utilizados na fabricação de papel e como estabilizadores de creme dental e sorvete (KOBAYASHI, 1986; MINHAS *et al.*, 2002); agar e carragenanas, que são polissacarídeos sulfatados ricos em galactose, encontradas em algumas espécies de algas vermelhas e usadas em diversas finalidades como na fabricação de cosméticos, gelatina e meios de cultura (RASMUSSEN; MORRISSEY, 2007; TRIUS; SEBRANEK, 1996).

### **1.2- Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.**

Dentre os diferentes compostos bioativos extraídos das algas, destacam-se os polissacarídeos sulfatados. Eles se localizam na matriz mucilagenosa das algas e sua função biológica parece estar relacionada com a proteção contra desidratação solar em períodos de baixa maré, além de oferecer uma maior flexibilidade à alga, permitindo assim, o seu crescimento em ambiente aquático, e uma rigidez suficiente para permanecer estendida e assim captar a luz e os nutrientes com mais eficácia (PERCIVAL; DOWELL, 1967).

#### **1.2.1- Polissacarídeos sulfatados de algas marrons.**

As *Phaeophyceas* possuem na sua constituição apenas um único grupo de polissacarídeos sulfatados: As fucanas (QUILLET, 1961). Esses polímeros têm como característica principal a presença da L-fucose sulfatada na sua estrutura (LEITE *et al.*, 1998) e podem ser encontrados na forma de homo ou heteropolissacarídeos (KLOAREG; QUATRANO, 1988). É atribuído às fucanas uma gama de atividades farmacológicas, como mostra a tabela II.

Tabela II. Algumas das atividades farmacológicas atribuídas as fucanas

Atividade	Alga	Referências
Angiogênica	<i>Fucus vesiculosus</i>	(MATSUBARA <i>et al.</i> , 2005; SOEDA <i>et al.</i> , 2000)
Anti complemento	<i>Laminaria cichorioide</i> , <i>L. japonica</i> , <i>Fucus evanescens</i> <i>Ascophyllum nodosum</i>	(BLONDIN <i>et al.</i> , 1994; BOISSON-VIDAL <i>et al.</i> , 2007; ZVYAGINTSEVA <i>et al.</i> , 2000)
Anti migratória	<i>Fucus vesiculosus</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i>	(GIRAUX <i>et al.</i> , 1998; SOEDA, <i>et al.</i> , 2000)
Antiadesiva	<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Laminaria brasiliensis</i> , <i>S. schröderi</i> , <i>Sargassum stenophyllum</i>	(LIU; HAROUN-BOUHEDJA; BOISSON-VIDAL, 2000; ROCHA <i>et al.</i> , 2001)
Anticoagulante	<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Ecklonia kurome</i> , <i>Eisenia bicyclis</i> , <i>Dictyota menstrualis</i> , <i>Padina gmynospora</i>	(ALBUQUERQUE <i>et al.</i> , 2004; HAROUN-BOUHEDJA <i>et al.</i> , 2000; NISHINO <i>et al.</i> , 1991a; SILVA <i>et al.</i> , 2005)
Antioxidante	<i>Fucus vesiculosus</i> ; <i>Laminaria japonica</i>	(RUPEREZ; AHRAZEM; LEAL, 2002; WANG <i>et al.</i> , 2008)
Antiproliferativa	<i>Ascophyllum nodosum</i>	(ELLOUALI <i>et al.</i> , 1993; ELLOUALI; BOISSON-VIDAL; JOZEFONVISCZ, 1994)
Antitrombótico	<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Spatoglossum schröderi</i>	(BARROSO <i>et al.</i> , 2008; MAURAY <i>et al.</i> , 1998; ROCHA <i>et al.</i> , 2005b)
Antitumoral	<i>A. nodosum</i> , <i>Sargassum thumbergii</i> , <i>Eisenia bicyclis</i>	(QUEIROZ <i>et al.</i> , 2006; RIOU <i>et al.</i> , 1996; USUI; ASARI; MIZUNO, 1980; ZHUANG <i>et al.</i> , 1995)
Anti-úlceras	<i>Cladosiphon okamuranus</i>	(NAGAOKA <i>et al.</i> , 2000; SHIBATA <i>et al.</i> , 2000; SHIBATA <i>et al.</i> , 2001)
Antiviral	<i>Sargassum horneri</i> , <i>Cystoseira indica</i>	(HAYASHI, 2008; HOSHINO <i>et al.</i> , 1998; MANDAL <i>et al.</i> , 2007)
Antimetastático	<i>Fucus vesiculosus</i>	(COOMBE <i>et al.</i> , 1987)
Bloqueio de ligação célula-célula via selectina	<i>Fucus vesiculosus</i>	(TEIXEIRA; ROSSI; HELLEWELL, 1996)
Bloqueio de ligação espermatozoide-epitélio do oviducto	<i>Fucus vesiculosus</i>	(SUAREZ <i>et al.</i> , 1998)

Estímulo de síntese de heparan antitrombótico	<i>Spatoglossum schröder</i>	(BARROSO, <i>et al.</i> , 2008; ROCHA <i>et al.</i> , 2005a)
Fibrinolítica	<i>E. kurome</i> , <i>F. vesiculosus</i>	(DOCTOR; HILL; JACKSON, 1995; NISHINO <i>et al.</i> , 2000)
Impedir a rolagem de leucócitos	<i>Fucus vesiculosus</i>	(SHIMAOKA <i>et al.</i> , 1996)
Modificação da síntese de FN e trombospodina	<i>Fucus vesiculosus</i>	(VISCHER; BUDDECKE, 1991)

Adaptado de ROCHA *et al.*, 2006

### 1.2.2- Polissacarídeos sulfatados de algas verdes

Os polissacarídeos sulfatados de algas verdes são de longe os menos estudados quanto as suas atividades biológicas. Esses apresentam mais heterogeneidade do que aqueles encontrados nas outras algas o que dificulta o entendimento da relação do polissacarídeo com sua atividade biológica.

Os polissacarídeos sulfatados de algas verdes são ricos em galactose, manose, xilose, arabinose e/ou ácidos urônicos (JURD *et al.*, 1995a), porém já foram descritos homopolissacarídeos como arabinanas (HAYAKAWA *et al.*, 2000; SIDDHANTA *et al.*, 1999) e galactanas (FARIAS *et al.*, 2008; MATSUBARA *et al.*, 2001).

A importância farmacológica destes polissacarídeos sulfatados de algas verdes foi evidenciada por se ter verificado as atividades antiviral, anticoagulante e antitumoral, entretanto, o número de trabalhos realizados com estes polissacarídeos ainda é pequeno quando comparado com as fucanas (Ver Tabela III). Ultimamente, vários trabalhos têm relatado a estrutura molecular de polissacarídeos de algas verdes, o que poderá facilitar a elucidação dos mecanismos de ação destes compostos, bem como a relação atividade/estrutura (BILAN *et al.*, 2007; FARIAS *et al.*, 2008; LAHAYE; ROBIC, 2007).

**Tabela III. Atividades farmacológicas atribuídas aos polissacarídeos sulfatados de algas verdes**

<b>Atividade</b>	<b>Alga</b>	<b>Referências</b>
Anticoagulante	<i>Codium fragile</i> ; <i>C. vermilara</i> <i>C. isthmocladum</i>	(CIANCIA <i>et al.</i> , 2007; FARIAS, 2006)
Antiviral	<i>Caulerpa racemosa</i> ; <i>Ulva lactuta</i> ; <i>Codium latum</i>	(GHOSH <i>et al.</i> , 2004; LEE <i>et al.</i> , 2004)
Antitumoral	<i>Ulva lactuta</i>	(KAEFFER <i>et al.</i> , 1999)
hiperlipidemia.	<i>Ulva pertusa</i>	(PENGZHAN <i>et al.</i> , 2003)
Anti-angiogênico	<i>Codium cillindricum</i>	(MATSUBARA <i>et al.</i> , 2003)
Anti-hepatotóxico	<i>Ulva reticulata</i>	(BALAJI RAGHAVENDRA RAO; SATHIVEL; DEVAKI, 2004)

### 1.2.3- Polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas

As *Rhodophyceae* ou algas vermelhas apresentam as galactanas como polissacarídeos sulfatados característicos encontrados em sua composição. Porém, outros tipos de polissacarídeos sulfatados podem ser encontrados nas algas vermelhas como xilomananas sulfatadas (CARDOSO *et al.*, 2007; KOLENDER *et al.*, 1997)

Galactanas de algas vermelhas são polissacarídeos lineares com unidades alternantes de (1→3) β-D-galactopiranosose (Unidade A) e (1→4) 3,6-anidrogalactopiranosose ou α-galactopiranosose (Unidade B), apresentando diferentes graus e posições de sulfatação. De acordo com a estereoquímica da unidade B, as galactanas podem ser classificadas como: agaranas, onde esta unidade pertence à série L (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005); e carragenanas quando pertence à série D (ESTEVEZ; CIANCIA; CERESO, 2004; NAIK *et al.*, 1980).

Existem vários relatos na literatura sobre atividades farmacológicas/biológicas atribuídas a galactanas de algas vermelhas. Uma das mais estudadas é a antiviral. Representantes dessa classe de polissacarídeos obtidos de *Gigartina skottsbergii* e *Porphyridium sp.* apresentaram atividade frente ao HSV-1 e HSV-2 (CARLUCCI; SCOLARO; DAMONTE, 1999; HUHEIHEL *et al.*, 2002). A atividade anti-HIV também vem sendo relatada para diversas algas, como por exemplo: *Schizymeria pacifica*, *Eucheuma cottoni* (WITVROUW; DE CLERCQ, 1997) e *Nothogenia fastigiata* (DAMONTE *et al.*, 1994; WITVROUW; DE CLERCQ, 1997). Em um estudo mais detalhado foi demonstrado que a atividade antiviral de galactanas de *Chondrus ocellatus* estava relacionada com as suas massas moleculares, aquelas de menor tamanho apresentavam maior atividade (ZHOU *et al.*, 2004). Contudo, estudos semelhantes com polissacarídeos de outras algas se fazem necessário para que se possa afirmar que a menor massa molecular é importante para que uma galactana desempenhe essa atividade de forma considerável.

Recentemente, atividade antiparasitária foi atribuída a carragenanas: atividade antimalárica. Essa atividade foi relatada para três carragenanas com diferentes padrões de sulfatação, que inibiram “in vitro” o crescimento de *Plasmodium falciparum*, assim como, a adesão dessas a glicoproteína humana CD36 (ADAMS *et al.*, 2005).

A medicina veterinária também busca nos polissacarídeos sulfatados um fármaco potencial e entre estes temos carragenanas que mostraram entre 89-100% de atividade inibitória de ligação entre *Escherichia coli* e fibrinas de colágeno de tecidos bovinos (MEDINA, 2001).

Entre outras atividades relacionadas aos polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas temos: Atividade de inibição do sistema complemento por uma  $\lambda$ -carragenana de *Chondrus armatus* (ZVYAGINTSEVA *et al.*, 2000) e efeito inibitório da ligação de fator de crescimento de fibroblastos básico (HOFFMAN, 1993).

### **1.3- Atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.**

O aumento da incidência de doenças cardiovasculares vem impondo uma maior demanda por fármacos anticoagulantes. Contudo, mesmo a heparina, principal fármaco anticoagulante, apresenta diversas restrições de uso. Além disso, existe risco de contaminação por partículas virais, como príons causadores da



encefalopatia espongiiforme humana, já que a heparina é extraída principalmente de intestino de suínos e bovinos (NADER *et al.*, 2004; NADER *et al.*, 2001). Por outro lado, problemas tromboembólicos se apresentam em diferentes condições clínicas que variam para cada paciente, e a tendência atual do mercado farmacológico é buscar um fármaco específico para cada terapia.

Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas apresentam-se como um dos principais grupos de compostos com potencial anticoagulante/antitrombótico. Eles apresentam-se como promissores fármacos para a substituição da heparina, devido principalmente, a grande diversidade estrutural, o que fornece a possibilidade deles apresentarem mecanismo de ação diferente da heparina, e também devido ao fato de se eliminar a possibilidade de contaminação por partículas virais (ROCHA *et al.*, 2006).

A atividade anticoagulante associada com polissacarídeos de algas vermelhas vem sendo estudada desde sua primeira descrição por Chargaff (CHARGAFF; BANCROFT; STANLEY-BROWN, 1936).

Esses polissacarídeos têm propensão a formar complexos solúveis com proteínas plasmáticas, tal como o fibrinogênio e o seu mecanismo de ação se dá principalmente por via de inibição da trombina (SHANMUGAM; MODY; SIDDHANTA, 2001).

Três galactanas foram purificadas da alga *Botryocladia occidentalis* e denominadas F1, F2 e F3 de acordo com suas eluições em NaCl de uma coluna de gel filtração. Somente as frações F2 e F3 mostraram potente ação anticoagulante em testes de aPTT. Suas estruturas são formadas por unidades dissacarídicas repetidas de (1→4)-α-D-Gal-1→3-β-D-Gal com variáveis padrões de sulfatação, sendo que um terço das α-Gal são 2-3-dissulfatadas e os demais 1/3 são 2-O-sulfatadas. Nos testes de APTT, as frações F2 e F3 apresentaram respectivamente 150 UI/mg e 130 UI/mg e ambas potencializaram a inibição de trombina e fator Xa por AT (Antitrombina) e/ou HCII (Cofator II da heparina) (FARIAS *et al.*, 2000).

Em trabalho posterior foi purificada uma galactana da alga *Gelidium crinale* composta de uma α-gal e D-gal ligados na posição 1→3, com 15% das unidades α sendo 2-3-dissulfatadas e outros 55% sendo 2-sulfatadas. Quando desafiada ao teste de aPTT, a galactana apresentou 60 UI/mg, sendo sua ação dada pela potencialização da inibição da trombina pela AT e do fator Xa pelo HCII (PEREIRA *et al.*, 2005).

Os polissacarídeos de algas marrons são de longe os mais estudados quanto ao potencial anticoagulante desde 1941, quando foi descoberto tal potencial em extratos de algas do gênero *Laminaria* (KIMURA, 1941). Como destaques têm-se as algas *Fucus vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum* (CHEVOLOT *et al.*, 2000; HAROUN-BOUHEDJA, *et al.*, 2000; NISHINO *et al.*, 1991b). A ação inibitória destes compostos sobre a formação do coágulo de fibrina é principalmente através da potencialização de anticoagulantes naturais: antitrombina e cofator II da heparina (MINIX; DOCTOR, 1997; NISHINO; AIZU; NAGUMO, 1991). Contudo, inibição do fator Xa, uma proteína participante da cascata da coagulação, também pode ocorrer em menor escala (DROZD *et al.*, 2006; NISHINO *et al.*, 1999).

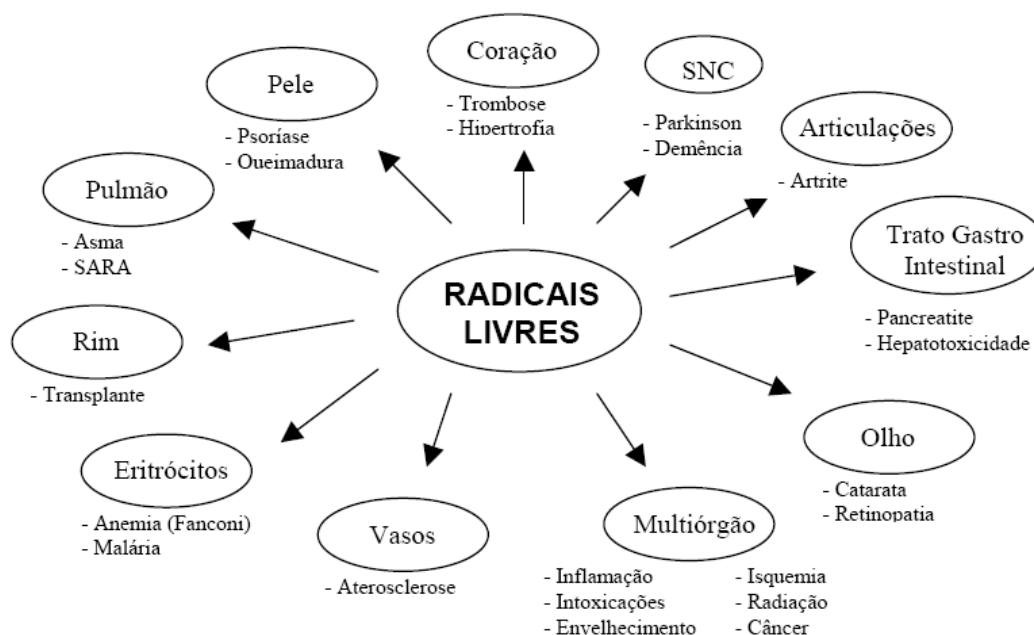
Muitas fucanas podem agir também de forma indireta na alteração do processo de coagulação, como promovendo a liberação do TFPI (inibidor do fator tecidual) ou de heparan sulfato, um glicosaminoglicano sulfatado produzido pelas células endoteliais que apresenta ação antitrombótica (GIRAUX *et al.*, 1998; ROCHA *et al.*, 2005a). Nesse último caso, foram extraídas da alga *Spatoglossum schröderi* três fucanas denominadas A, B e C que quando submetidas a testes anticoagulantes “in vitro” (Tempo de tromboplastina parcialmente ativada- aPTT; Tempo de protrombina- PT; Tempo de trombina- TT) não apresentaram nenhuma atividade considerável (LEITE, *et al.*, 1998; ROCHA, *et al.*, 2005a). Contudo, as fucanas A e B apresentaram atividade antitrombótica “in vivo” e foi atribuído essa atividade ao fato dessas fucanas estimularem a síntese do heparan sulfato antitrombótico (BARROSO, *et al.*, 2008; ROCHA, *et al.*, 2005a).

Os polissacarídeos de algas verdes são os menos explorados, e dentre essas o gênero *Codium* é o que mais vem sendo estudado. O primeiro relato de polissacarídeos anticoagulantes de *Codium* foi feito por Deacon-Smith (DEACON-SMITH; LEE--POTTER; ROGERS, 1985). Esses autores trabalharam com quarenta e cinco espécies de *Codium* e verificaram que os polissacarídeos dessas algas, na maioria galactanas, apresentaram atividade anticoagulante nos testes de APTT, PT e TT (DEACON-SMITH; LEE-POTER; ROGERS, 1985). Posteriormente, foi extraído e purificado da *Codium fragile* um anticoagulante composto de xilose, arabinose e galactose que teve sua ação na potencialização do Cofator II da Heparina (HC II) e Antitrombina (AT) (JURD *et al.*, 1995b). Um homopolissacarídeo sulfatado constituído de arabinose foi extraído de *Codium dwarkense* e mostrou potencial anticoagulante para o teste de TT (tempo de trombina) similar ao da heparina (140,3

UI/mg), além de dobrar o tempo de coagulação em relação ao tempo controle para os testes de PT e aPTT a partir das concentrações de 100 µg/mL e 20 µg/mL, respectivamente (SIDDHANTA, *et al.*, 1999).

#### 1.4- Atividade antioxidante de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.

Em anos recentes, estudos com polissacarídeos sulfatados de algas marinhas têm demonstrado que esses polímeros também apresentam um papel importante no seqüestro de radicais livres. Radicais livres são definidos como átomos ou moléculas que apresentam elétrons despareados (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Estes são responsáveis por uma gama de desordens, entre elas doenças cardiovasculares, isquemia, mal de Alzheimer, além de estarem diretamente envolvidos com inflamação, envelhecimento e a formação de câncer (Figura 01) (CUZZOCREA *et al.*, 2001; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).



Fonte: FERREIRA; MATSUBARA, 1997

**Figura 01. Disfunções associadas aos radicais livres.**

Estudos recentes mostraram que fucanas apresentam um potencial antioxidante mediado principalmente através da inibição de radicais superóxido e seqüestro de peróxido de hidrogênio (HEO *et al.*, 2005; WANG, *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2003)

Em acordo com este dado, extratos polissacarídicos de sete algas marrons apresentaram atividade antioxidante, principalmente através do ensaio de seqüestro de radical superóxido, inclusive com resultados superiores aqueles vistos para antioxidantes comerciais (HEO, *et al.*, 2005). Já F3, uma fucana purificada da alga *Laminaria japonica*, apresentou excelente atividade antioxidante para o ensaio de seqüestro de radical superóxido, e de forma interessante inibiu cerca de 80% dos radicais hidroxila formados, sendo o primeiro polissacarídeo sulfatado demonstrado por apresentar atividade antioxidante através deste mecanismo (WANG, *et al.*, 2008).

Diferente desses resultados, uma fucana da alga *Fucus vesiculosus* mostrou atividade antioxidante através do ensaio de poder antioxidante pela redução do íon férrico (RUPEREZ; AHRAZEM; LEAL, 2002).

Poucos estudos têm sido realizados com atividade antioxidante de polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas e algas verdes. Contudo, a literatura mostra que as espécies desses grupos são fontes de potenciais compostos utilizados em terapias antioxidantes. Três polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Phorphyra haitensis* apresentaram atividade antioxidante através da inibição dos radicais superóxidos, além de inibir de forma significativa a peroxidação lipídica, e inibir parcialmente a hemólise de eritrócitos de ratos induzidas por peróxido de hidrogênio (ZHANG, *et al.*, 2003).

Ulvana, um polissacarídeo sulfatado extraído da alga verde *Ulva lactuca*, apresentou baixo poder antioxidante, entretanto, quando modificada pela adição de grupamentos benzoil e acetil passou a mostrar excelente atividade antioxidante, principalmente para o ensaio de radicais superóxido, que inclusive foi superior aquela vista para a vitamina C (QI *et al.*, 2006).

### 1.5- Atividade antiproliferativa de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.

Estudos recentes revelados pelo Ministério da Saúde em parceria com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimam que surjam cerca de 500.000 novos casos de câncer no Brasil somente em 2008 (Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil, 2007). Esta realidade, que se reflete em todo o mundo, especialmente em países desenvolvidos, tem aumentado a busca por compostos com potencial anticancerígeno.

Nesse sentido, diversos trabalhos foram realizados com polissacarídeos sulfatados de algas marinhas. Existem vários trabalhos na literatura que mostram polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividades antitumorais, entretanto, poucos estudos têm avaliado o potencial terapêutico dos polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas.

Galactanas extraídas das algas vermelhas *Bostrychia montagnei* e *Porphyra columbina* promoveram atividade antiproliferativa frente à linhagem celular tumoral de cólon uterino HeLa. Na concentração máxima de 0.08 µg/mL estes polissacarídeos sulfatados promoveram mitoses atípicas com presença de núcleos atípicos (STEVAN *et al.*, 2001).

Recentemente, uma galactana da alga *Chondrus ocellatus* foi degradada através de hidrólise ácida em cinco produtos oligossacarídicos com pesos moleculares distintos, variando de 9.3 a 650 kDa, e foram posteriormente testadas quanto a capacidade antitumoral “in vivo” frente as linhagens de sarcoma S-180 e hepatoma H-22. Na dose de 200 mg/Kg/dia, os produtos com pesos moleculares de 9.3 e 15 kDa apresentaram as maiores taxas de inibição tumorais com 66.1% e 68.9%, respectivamente. Nesse mesmo trabalho foi demonstrada uma correlação positiva entre a inibição tumoral e o aumento da atividade de células NK (Natural Killer) e proliferação de linfócitos (ZHOU, *et al.*, 2004). Ulteriormente, galactanas degradadas de *C. ocellatus* potencializou o potencial antitumoral do quimioterápico 5-Fu (Fluorouracil) frente à linhagem celular H-22 (ZHOU *et al.*, 2006).

Para as fucanas, o bloqueio do ciclo celular impedindo a proliferação das células tumorais (JI; GAO; ZHANG, 2004; RIOU, *et al.*, 1996) e a ativação de diferentes vias de apoptose, especialmente via das caspases (AISA *et al.*, 2005; TERUYA *et al.*, 2007) parecem ser os principais mecanismos antitumorais.

Entretanto, alguns trabalhos mostram fucanas agindo através de mecanismos diferentes, em especial pela potencialização de células NK e aumento da produção de IFN- $\gamma$  (interferon gama) em células T (MARUYAMA *et al.*, 2006) ou impedindo a adesão celular à matriz extracelular (ROCHA, *et al.*, 2001).

No estado do Rio Grande do Norte há registro de mais de cem diferentes espécies de algas marinhas, entretanto, poucas algas tiveram seus polissacarídeos avaliados no que diz respeito à descoberta de polímeros com atividades biológicas, o que não se justifica, pois cada alga apresenta pelo menos um polissacarídeo sulfatado inerente a sua espécie, não encontrado em outras espécies, e, portanto, possui atividades farmacológicas diferentes e/ou mais potentes do que outros compostos. Então, o isolamento de um novo polissacarídeo sulfatado algal traz sempre novas perspectivas de descoberta de um novo fármaco, bem como um maior desenvolvimento econômico para aquelas comunidades que já cultivam algas, por inserir uma maior diversidade de produtos, e por inserir, possivelmente, um produto de maior valor agregado. Baseado nisso, este presente estudo tem como objetivos:

Extrair polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha *Gracilaria caudata*, utilizando uma metodologia já estabelecida em nosso laboratório;

Determinar a composição química dos polissacarídeos extraídos;

Analisar a atividade anticoagulante desses compostos, utilizando kits comerciais de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e tempo de protrombina (PT);

Analisar o potencial antioxidante desses polissacarídeos através de diferentes ensaios *in vitro* (capacidade antioxidante total; seqüestro de radical hidroxila; seqüestro de radical superóxido; quelação férrica; poder redutor).

Verificar a existência de atividade antiproliferativa dos polissacarídeos sulfatados frente a linhagem celular tumoral de cólon uterino, HeLa.



## 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1– MATERIAL BIOLÓGICO

Alga marinha vermelha *Gracilaria caudata*

Filo: Rhodophyta

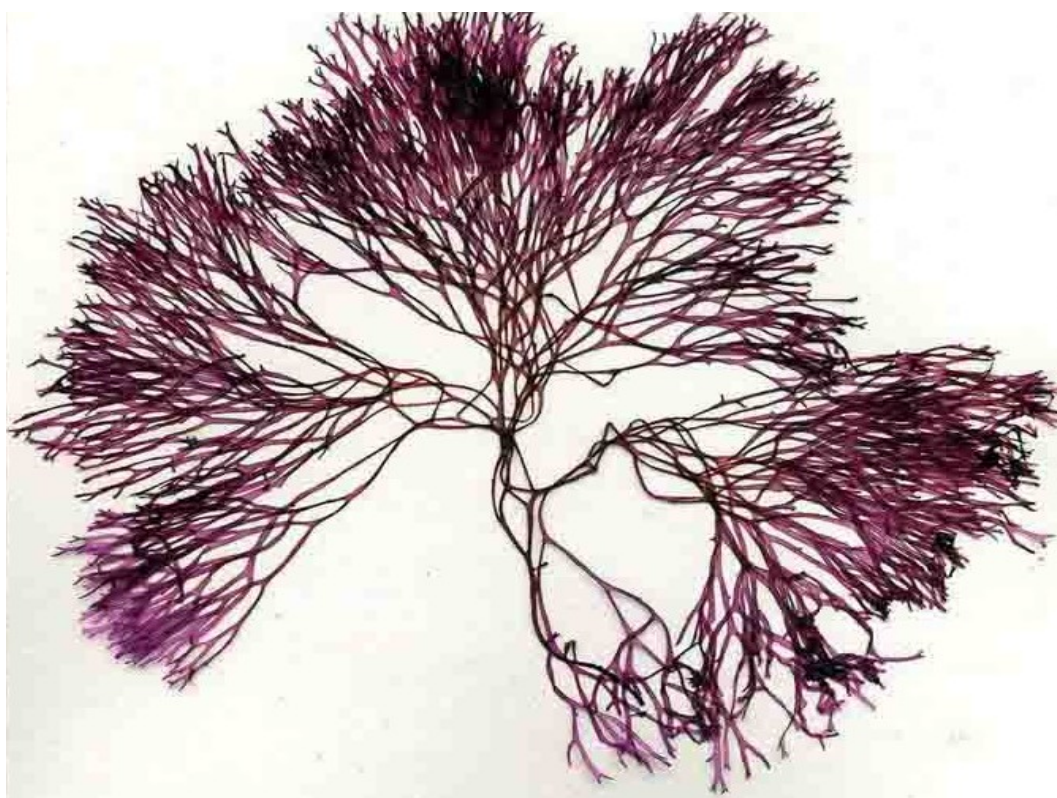
Classe: Florideophyceae

Ordem: Gracilariales

Família: Gracilariaceae

Gênero: *Gracilaria*

Espécie: *Gracilaria caudata*



**Figura 02.** Alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* objeto de estudo neste trabalho.

A

alga utilizada neste trabalho foi coletada na praia de Maracajaú no litoral norte do Rio Grande do Norte em marés baixas (entre 0.0 e 0.2 metros), em diferentes

períodos durante os anos de 2006 a 2008. Após ser coletada, a alga foi levada ao laboratório (BIOPOL – Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais), onde foi lavada e retiradas as epífitas e inclusões calcárias. Em seguida ela foi seca em estufa a 45°C, triturada e guardada em recipientes apropriados. A alga foi identificada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Marinho (Departamento de Oceanografia e Limnologia).

## **2.2 – OUTROS MATERIAIS**

### **2.2.1 – Reagentes**

- Acetona, metanol, etanol, da Qeel (São Paulo – SP).
- Ácido acético, Cloreto de sódio, da VETEC (Rio de Janeiro – RJ).
- Álcool 96°, da Sertanejo (Dix Sept Rosado – RN).
- Agarose, adquirida da Bio Agency (São Paulo – SP).
- Ácido sulfúrico, ácido clorídrico, da Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Azul de toluidina, vermelho de cresol, coomasie blue R 250, oriundos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).
- Estreptomicina/Penicilina, Gibco Invitrogen (California, Estados Unidos).
- Maxatase (protease alcalina P 126), da BIOCON do Brasil industrial Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Meio DMEM Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).
- 1,3 diamino propano acetato, da Aldrich Chemical Co. Inc. (Milwake, WI, EUA).

Todos os demais reagentes utilizados foram da melhor qualidade disponível.

### **2.2.2 – Padrões**

- L-fucose, D-xilose, D-galactose, D-manose, D-glucose, D-arabinose, D-ramnose, ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA ).

### **2.2.3 – Aparelhos**

- Agitador orbital modelo 255-B da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Banhos e estufas de temperatura constante da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Bombas peristálticas Microperpex S modelo 2232 da LKB (Bromma, Suécia) e Econo
- Câmara para eletroforese em gel de agarose (Técnica Permatron Ltda., São Paulo, SP, Brasil).



- Centrífuga refrigerada CR 21 da Hitachi Koki Co. Ltd. (Tóquio, Japão);
- Espectrofotômetros Femto 700 plus da Femto Ind. Com. Instrumentos LTDA (São Paulo, SP- Brasil).
- Fluxo laminar vertical. VECO (Campinas, SP-Brasil).
- Fontes de corrente contínua regulável desenvolvidas pelo Dr. H. Rzeppa, Técnica.
- Incubadora de CO<sub>2</sub> Thermoforma (São Paulo, SP-Brasil).
- Medidor de pH Orion Research, modelo 701 A/digital Ionalyzer (Cambridge, MA, EUA).
- Microscópio Invertido NIKON Eclipse TE300.

#### **2.2.4 – Plasma humano**

O sangue humano foi coletado sobre citrato de sódio (concentração final 0,82%), sob agitação leve, em frasco de polietileno esterilizado. O plasma foi separado por centrifugação e alíquotas de 10 mL foram estocadas a -20°C em frascos de vidro esterilizados.

#### **2.2.5. Células tumorais**

HeLa, uma linhagem celular tumoral de cólon uterino, foi gentilmente doada pelo Departamento de Genética da UFRN. Células HeLa foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Ao meio DMEM foram adicionados Estreptomicina (5000 µg/mL)/Penicilina (5000 UI). As células foram mantidas em ambiente estéril com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **2.3 – OBTENÇÃO DO “PÓ CETÔNICO”**

A alga utilizada neste trabalho foi submetida à despigmentação e delipidação, com a adição de dois volumes de acetona PA. Esta solução ficou à temperatura ambiente durante o período de 24 horas. Posteriormente, a mistura foi decantada e o resíduo colocado para secar. Esse resíduo, denominado de “Pó Cetônico”, foi utilizado em seguida na proteólise.

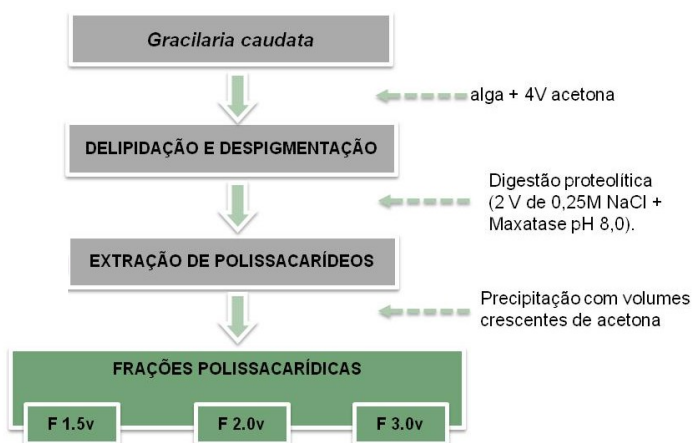
### **2.4 – OBTENÇÃO DO EXTRATO POLISSACARÍDICO (PROTEÓLISE)**

Para a realização desta etapa, foram adicionados dois volumes de NaCl 0,25 M ao “Pó cetônico” (100 g) tendo, essa solução, seu pH ajustado para as condições ideais da enzima maxatase (pH 8.0). O recipiente com esse material foi colocado em banho-maria a 60°C durante um período de 16 horas. Depois, este foi filtrado e o sobrenadante submetido a uma centrifugação (10.000 g, durante 10 minutos à 4°C).

Após a centrifugação, uma alíquota do sobrenadante, que contém todos os polissacarídeos solúveis, foi retirada e a ela foram adicionado dois volumes de metanol para precipitação dos polissacarídeos existentes neste extrato. Esta solução foi deixada à temperatura ambiente durante 24 horas. Após esse período, o material foi centrifugado (10.000 g, durante 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco à pressão reduzida, triturado, pesado e devidamente guardado para posterior análise através da eletroforese em gel de agarose. Este material foi denominado extrato bruto. O restante do sobrenadante obtido teve seu volume devidamente medido e foi utilizado na etapa posterior.

## 2.5 – FRACIONAMENTO COM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ACETONA

À solução rica em polissacarídeos foram adicionados volumes crescentes de acetona. As frações obtidas foram mantidas por 18 horas a 4°C. Posteriormente foram centrifugadas (10.000 g, durante 10 minutos a 4°C) e secas à pressão reduzida. Dessa maneira foram obtidas seqüencialmente as seguintes frações: F 1.5v; F 2.0v e F 3.0v. Esse processo de fracionamento pode ser melhor visualizado na Figura 03. Após secas, as frações polissacarídicas foram pesadas, e posteriormente foi determinada a contribuição percentual de cada fração com relação à soma do peso seco total das frações polissacarídicas.



**Figura 03. Metodologia de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga *Gracilaria caudata*.**

## 2.6 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O gel de agarose foi preparado na concentração 0,6% no tampão 1,3 diamino propano acetato (PDA) e colocado sobre lâminas de vidro (7,5 X 7,5 cm X 1,5 mm, ou 5,0 X 7,5 cm X 1,5 mm). Cinco microlitros de cada fração polissacarídica na concentração de 10 mg/mL foram aplicadas em canaletas no gel e submetidos à eletroforese em cuba resfriada a 4°C. Nas eletroforeses realizadas, foram utilizados como padrões glicosaminoglicanos sulfatados (HS – heparam sulfato; CS – condroitim sulfato; DS – dermatam sulfato). Após a corrida eletroforética (a 100 Volts), os compostos foram precipitados com CETAVLON 0,1% por no mínimo 2 horas, a temperatura ambiente. Depois, o gel foi submetido a uma corrente de ar quente para ser secado e corado com azul de toluidina 0,6%. O excesso de corante foi removido por uma solução de ácido acético 1% em etanol 50% (solução descorante). Após remoção do corante em excesso, a lâmina revelada foi seca à temperatura ambiente e analisada.

## 2.7 – ANÁLISES QUÍMICAS

### 2.7.1 – Dosagem de açúcares totais

Açúcares totais foram determinados pelo método do fenol/ácido sulfúrico, utilizando-se como padrão galactose, sendo as leituras realizadas a 490 nm (Dubois *et al.*, 1956).

### 2.7.2 – Dosagem de sulfato

O teor de sulfato total foi quantificado, após uma hidrólise ácida com 4N de HCl por 6 horas à temperatura de 100°C de cada fração polissacarídica, por turbidimetria pelo método da gelatina-bário, tendo-se como padrão o sulfato de sódio (DODGSON; PRICE, 1962).

### 2.7.3 – Dosagem de proteínas

O teor de proteína correspondente de cada fração foi determinado com o reagente de comassie blue R 250 e a leitura realizada a 595 nm (SPECTOR, 1978).

### 2.7.4 – Cromatografia em papel (sistema descendente)

As frações polissacarídicas obtidas nos processos de fracionamento com acetona (F1,5v; F2,0v; F3,0v) foram hidrolisadas com 2N de HCl por 2 horas a temperatura de 100°C. Após hidrólise, as frações foram secas (3 vezes) a pressão reduzida na presença de pastilhas de NaOH. Por fim o hidrolisado foi ressuspenso, e

100 µg de cada amostra foi aplicada em papel Whatman nº 01 e submetido ao sistema de solventes Acetato de etila: piridina: água (8:2:1) v/v. 10 µg de cada padrão monossacarídico foi aplicado juntamente com as amostras (Galactose, xilose, glicose, rafinose, ácido glucurônico e arabinose).

Os compostos com poder redutor foram visualizados através de revelação com prata em meio alcalino (TREVELYAN; PROCTER; HARRISON, 1950).

### **2.7.5 – Fenólicos Totais**

O teor de fenólicos totais foi estimado pelo método de Folin-Ciocalteu (TAGA; MILLER; PRATT, 1984) A 6,0 mL de água destilada foram adicionados 0,1 mL de amostra, para uma concentração final de 2,0 mg/mL, e 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, seguido da adição de 1,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%). O volume final foi ajustado para 10,0 mL. Após incubação de 30 minutos a 25 ° a absorbância foi medida em 760 nm e o conteúdo de fenólicos totais foi calculado com a utilização de ácido gálico como padrão fenólico.

## **2.8 – ATIVIDADE ANTICOAGULANTE**

Os ensaios de tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e tempo de protrombina (PT) foram realizados seguindo o protocolo fornecido pelos “kits” comerciais adquiridos (Labtest, Minas Gerais/Brasil). O “pool” de plasma citratado utilizado nestes ensaios foi obtido após a centrifugação de sangue humano retirado de indivíduos adultos, sadios e de ambos os sexos. Foi verificada, através desses ensaios, a massa de cada fração polissacarídica, necessária para prolongar em duas vezes o tempo normal de coagulação. Foram utilizadas como meio de comparação da atividade anticoagulante, a heparina e clexane (heparina de baixo peso molecular), polissacarídeos sulfatados de origem animal utilizados comercialmente como ferramenta anticoagulante. O tempo de coagulação foi determinado utilizando-se um coagulômetro automático da marca Drake (São Paulo, Brasil).

## **2.9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

### **2.9.1. Atividade antioxidante total**

O ensaio é baseado na redução de Molibdênio+6 para Molibdênio+5 pelo polissacarídeo sulfatado e subsequente formação de um complexo esverdeado Fosfato/ Molibdênio+5 em pH ácido (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Os tubos

contendo polissacarídeos sulfatados e reagentes (0.6 M ácido sulfúrico, 28 mM fosfato de sódio e 4 mM molibdato de amônia) foram incubados à 95° C por 90 min. Posteriormente, a absorbância de cada solução foi medida a 695 nm contra um branco. A capacidade antioxidante total é expressa em equivalentes de ácido ascórbico, um composto com atividade antioxidante conhecida.

### 2.9.2. Sequestro de radicais hidroxilas

A atividade seqüestradora dos radicais hidroxilas pelos polissacarídeos sulfatados foi investigada usando a reação de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$ ). Esses resultados são expressos como porcentagem de inibição. Radicais hidroxila serão gerados usando o método de previamente descrito (SMIRNOFF; CUMBES, 1989) com pequenas modificações. Em 3 mL de tampão fosfato (150 mM, pH 7,4), foi adicionado 10 mM  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mM EDTA, 2 mM salicilato de sódio, 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{L}$ ) e variadas concentrações de frações polissacarídicas (10, 50, 100, 500 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). No controle, tampão fosfato substitui  $\text{H}_2\text{O}_2$ . As soluções foram incubadas a 37° C por 1h, e a presença dos radicais hidroxilas foi monitorada a 510 nm.

### 2.9.3. Sequestro de radicais superóxido

O ensaio é baseado na capacidade dos polissacarídeos sulfatados em inibir a redução fotoquímica do nitroblue tetrazolium (NBT) no sistema riboflavina-luz-NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971; DASGUPTAA; DE, 2007). Cada 3 mL da reação contém 50 nM de tampão fosfato (pH 7.8), 13 mM de metionina, 2  $\mu\text{M}$  riboflavina, 100  $\mu\text{M}$  EDTA, NBT (75  $\mu\text{M}$ ), e 1 mL de solução contendo as frações polissacarídicas (1, 5, 10, 25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A produção do azul de formazan foi monitorada pelo aumento da absorbância a 560 nm após iluminação com lâmpada fluorescente por 10 min. A reação foi realizada em câmara dissipadora de luz. Tubos idênticos com os reagentes foram colocados no escuro e utilizados como branco.

### 2.9.4. Quelação férrica

A habilidade quelante de íons ferrosos pelos polissacarídeos sulfatados foi investigada de acordo método descrito anteriormente (DECKER; WELCH, 1990) e com posteriores modificações (WANG *et al.*, 2008). A reação contendo  $\text{FeCl}_2$  (0.05 mL, 2 mM), e ferrozina (0.2 mL, 5 mM), foi agitada e incubada por 10 min à temperatura ambiente. A absorbância da reação é medida a 562 nm contra um branco.

### 2.9.5. Poder redutor

O poder redutor das amostras foi quantificado de acordo com metodologia previamente descrita (ATHUKORALA; KIM; JEON, 2006; WANG, *et al.*, 2008). 4 mL da reação contendo diferentes concentrações dos polissacarídeos sulfatados em tampão fosfato (0.2 M, pH 6.6) e ferricianeto de potássio (1%) foram incubados por 20 min. à 50°C. A reação foi terminada pela adição da solução de Ácido Tricloroacético (TCA) a 10%, e posteriormente misturada com água destilada e cloreto de ferro (0,1%). A absorbância foi medida a 700 nm.

### 2.10. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

A viabilidade celular da linhagem celular tumoral HeLa foram tratadas com as diferentes concentrações das frações polissacarídicas da alga *G. caudata* e avaliadas pelo método colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenil tetrazolium bromide) (MOSMANN., 1983). Este método é baseado na redução do MTT a formazan pelas células vivas.  $5 \times 10^3$  células foram colocadas em placas de Elisa estéril de 96 poços para um volume final de 100  $\mu$ L de meio DMEM 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, as células foram incubadas com diferentes concentrações dos polissacarídeos sulfatados (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 5,0 mg/mL). Após 72 horas, MTT (5 mg/mL) foi adicionado às células, e incubados por mais 4 horas. Após este período, o meio foi aspirado, e adicionou-se 100  $\mu$ L de HCl 0,04N em álcool isopropílico para dissolver os cristais de formazan formados e precipitados. A quantificação da absorbância foi feita em leitor de Elisa em comprimento de onda de 562 nm. O ensaio foi realizado em quintuplicata. O cálculo de inibição da proliferação celular foi realizado em comparação com o controle contendo células não tratadas com os polissacarídeos sulfatados.

### 2.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados dos experimentos realizados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para testar diferenças entre frações, bem como diferentes tratamentos da mesma fração, foi utilizado o teste de análise paramétrica de análise de variância (ANOVA; SPSS 10.0 para Windows; SPSS Inc., Chicago, IL). O teste de Student–Newman–Keuls (Nível de significância de  $p < 0,01$ ) foi aplicado para se comprovar algumas similaridades encontradas pela ANOVA.

### 3 – RESULTADOS

#### 3.1. Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados da alga *Gracilaria caudata*.

A alga *G. caudata* foi coletada na praia de Maracajaú-RN de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. Após o processo de proteólise, o extrato polissacarídico foi submetido ao fracionamento diferencial com volumes crescentes de acetona obtendo-se assim três frações polissacarídicas denominadas F1,5v; F2,0v e F3,0v.

Após secas, as frações polissacarídicas foram pesadas e o rendimento percentual individual de cada fração foi obtido. A fração 1,5v apresentou o maior rendimento representando 82% do total da soma do peso de todas as frações. A contribuição percentual das frações 2,0v e 3,0v representaram 12% e 6%, respectivamente, como mostra a figura 04.

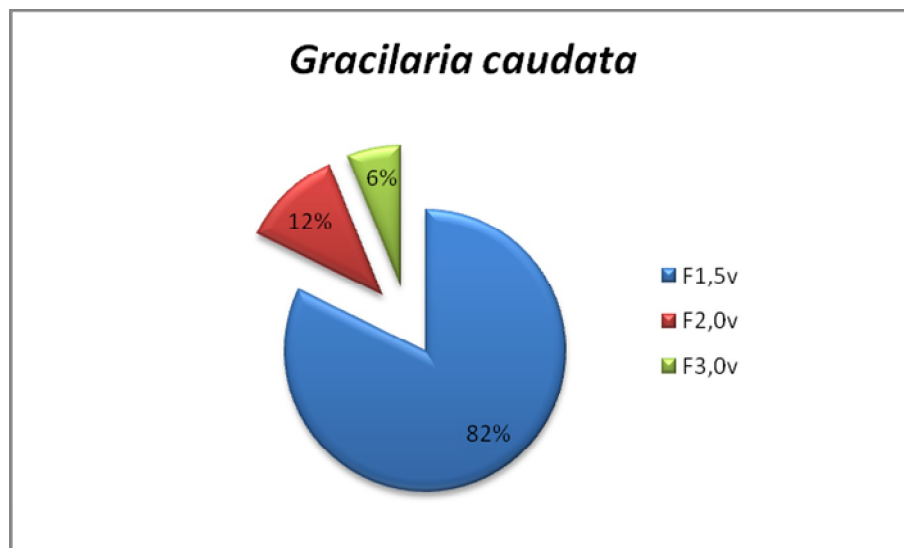


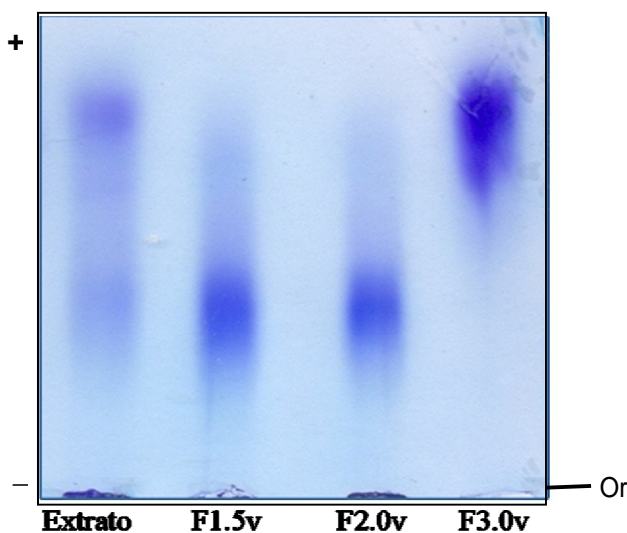
Figura 04. Rendimento percentual das frações obtidas por precipitação com acetona, da alga marinha *G. caudata*.

#### 3.2. Eletroforese em gel de agarose dos polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata*.

Para visualizar a presença de polissacarídeos sulfatados, as frações obtidas através do fracionamento com acetona foram submetidas à eletroforese em gel de agarose com Tampão PDA. O perfil eletroforético dos polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata* foi analisado após a coloração da lâmina com azul de toluidina, o



qual interage com compostos sulfatados e passa a apresentar coloração violácea. Dessa forma, verificou-se a presença de duas populações de polissacarídeos sulfatados (Figura 05). As frações F1,5v e F2,0v apresentaram bandas eletroforéticas com migração semelhante enquanto a fração F3,0v apresentou uma única banda em sua composição, porém com migração eletroforética distinta daquela vista nas outras frações da alga *G. caudata*.



**Figura 05. Perfil eletroforético das frações polissacarídicas da alga *Gracilaria caudata*.** Alíquotas de 5 $\mu$ l (50 $\mu$ g) das frações provenientes do fracionamento com acetona foram aplicados em lâminas de agarose em tampão PDA 0,05 M, pH 9,0. Ori - Origem

### 3.3. Análises químicas dos polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata*.

Para se determinar a quantidade de polissacarídeos e sulfato existentes nas frações obtidas das algas, assim como o grau de contaminação dessas por proteínas e compostos fenólicos foram feitas dosagens químicas de açúcares totais, sulfato, proteínas e fenólicos totais em todas as frações polissacarídicas. A Tabela III sumariza os resultados obtidos.

A fração F1,5 apresentou percentual de açúcares totais cerca de duas vezes maior que ao encontrado para F2,0v e F3,0v. O percentual de açúcares totais obtido para as frações F1,5v, F2,0v e F3,0v foi 32,8%, 16,7% e 17,2%, respectivamente.



Como já era esperado, todas as frações apresentaram sulfato em sua composição, sendo F2,0v, a fração com o maior teor de sulfato (6,0%).

O teor de contaminação protéica foi baixo para todas as frações polissacarídicas, atingindo o máximo de 2,0% na fração F3,0v e o mínimo de 0,7% na fração 2,0v. Já para a contaminação fenólica, foram encontrados resultados ainda mais baixos, com as frações F2,0v e F3,0v apresentando um percentual de 0,1% de fenólicos totais, enquanto F1,5v apresentou contaminação fenólica de apenas 0,05% (Tabela IV).

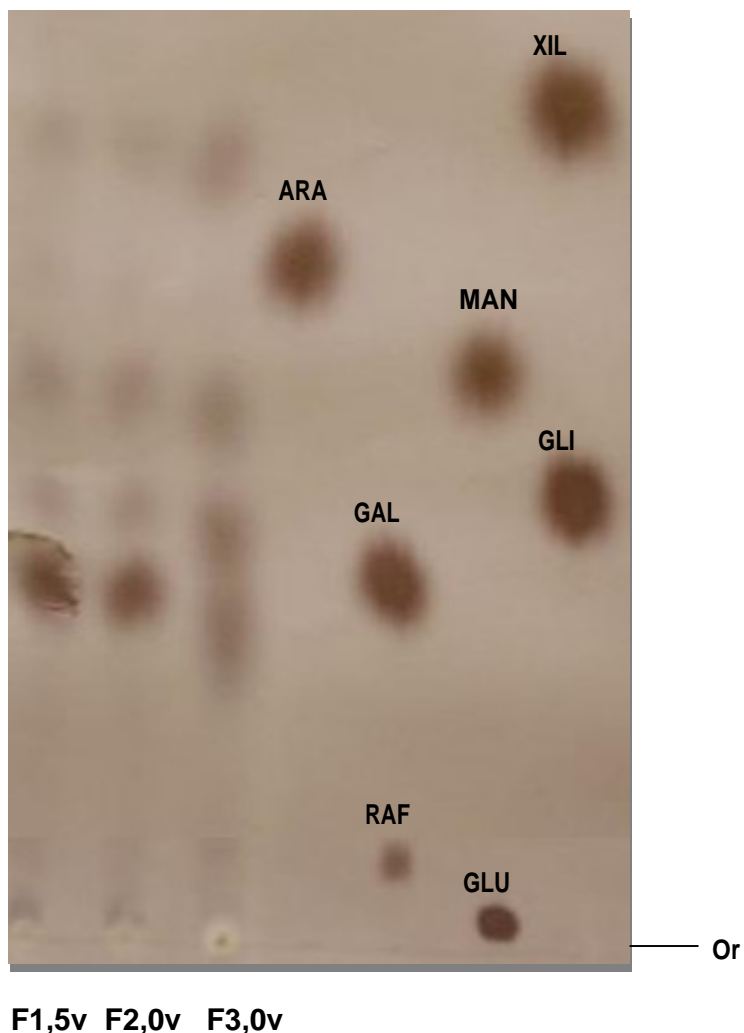
**Tabela IV. Composição química das frações polissacarídicas obtidas da alga *G. caudata***

<b>Frações</b>	<b>Açúcares totais (%)</b>	<b>Sulfato (%)</b>	<b>SO<sub>3</sub>/aç</b>	<b>Proteínas (%)</b>	<b>Fenólicos totais (%)</b>
<b>F1,5v</b>	32,80	4,50	0,13	1,20	0,05
<b>F2,0v</b>	16,70	6,00	0,35	0,70	0,10
<b>F3,0v</b>	17,20	3,00	0,17	2,00	0,10

#### **3.4. Cromatografia em papel descendente dos polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata*.**

Depois de confirmada a presença de polissacarídeos sulfatados nas diferentes frações da alga *G. caudata*, estas foram submetidas à cromatografia em papel descendente no sistema de Acetato de etila:Piridina:Água (8:2:1). Esta técnica permite de forma qualitativa verificar a composição monossacarídica existente. Como se pode observar na Figura 06, todas as frações apresentaram a mesma constituição monossacarídica: galactose; glicose; manose e xilose. Entretanto a distribuição quantitativa destes monossacarídeos não foi uniforme nas diferentes frações polissacarídicas. A galactose aparece como o principal monossacarídeo das frações polissacarídicas, principalmente para as frações F1,5v e F2,0v, já que se

pode observar a presença de bandas de galactose mais densas que aquelas observadas para os demais monossacarídeos.



**Figura 06. Cromatografia descendente em papel dos hidrolisados das frações polissacarídicas da alga *G. caudata*.** Alíquotas de cada fração cetônica hidrolisada foram aplicadas nas origens correspondentes, juntamente com os padrões de monossacarídeos e submetidos a cromatografia em solvente Acetato de etila: piridina: água (8:2:1). **Or**, origem; **XIL**, xilose; **ARA**, arabinose; **GAL**, galactose; **MAN**, manose; **GLI**, glicose; **GLU**, ácido glucurônico; **RAF**, rafinose.

A análise quantitativa dos monossacarídeos observados na Figura 06 foi realizada por densitometria, o que permitiu verificar a relação molar de cada monossacarídeo para as diferentes frações polissacarídicas (Tabela V). Todas as

frações apresentaram galactose como principal monossacarídeo, motivo pelo qual a galactose foi utilizada como referência para a relação molar com os demais monossacarídeos. A fração F1,5v foi a que apresentou maior proporção de galactose em relação aos demais monossacarídeos, enquanto F3,0v apresentou uma relação quase equimolar entre seus monossacarídeos, o que significa uma menor participação de galactose.

A relação molar galactose/sulfato também foi determinada. Dentre todas as frações, F2,0v apresentou a maior relação molar Galactose:sulfato (1,0:2,0) seguida da F3,0v e F1,5v com relação molar de 1,0:1,8 e 1,0:1,0, respectivamente.

**Tabela V. Relação molar dos constituintes químicos das frações polissacarídicas da alga *G. caudata*<sup>1</sup>.**

Frações	Galactose	Glicose	Manose	Xilose	Sulfato <sup>2</sup>
F1,5v	1,0	0,2	0,3	0,2	1,0
F2,0v	1,0	0,5	0,6	0,4	2,0
F3,0v	1,0	0,9	0,8	0,6	1,8

<sup>1</sup> relação molar de açúcar, tendo a galactose como referência

<sup>2</sup> Para relação molar, foi utilizado o percentual de sulfato da tabela IV para cada 100 µg de fração.

### **3.5. Atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados extraídos da alga *G. caudata*.**

Os polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata* após análises químicas, foram submetidas a testes de atividade anticoagulante como descrito em Materiais e Métodos, utilizando-se de “kits” comerciais de aPTT (via intrínseca da coagulação) e de PT (via extrínseca da coagulação). Em todas as concentrações testadas (0,1; 0,5; 2 mg/mL), nenhuma das três frações alterou o tempo de coagulação em comparação

ao controle salino tanto para o teste de aPTT quanto para o teste de PT (Tabela VI). Esse resultado mostra a ausência de potencial anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata*.

**Tabela VI. Tempo de coagulação das frações polissacarídicas da alga *G. caudata*.**

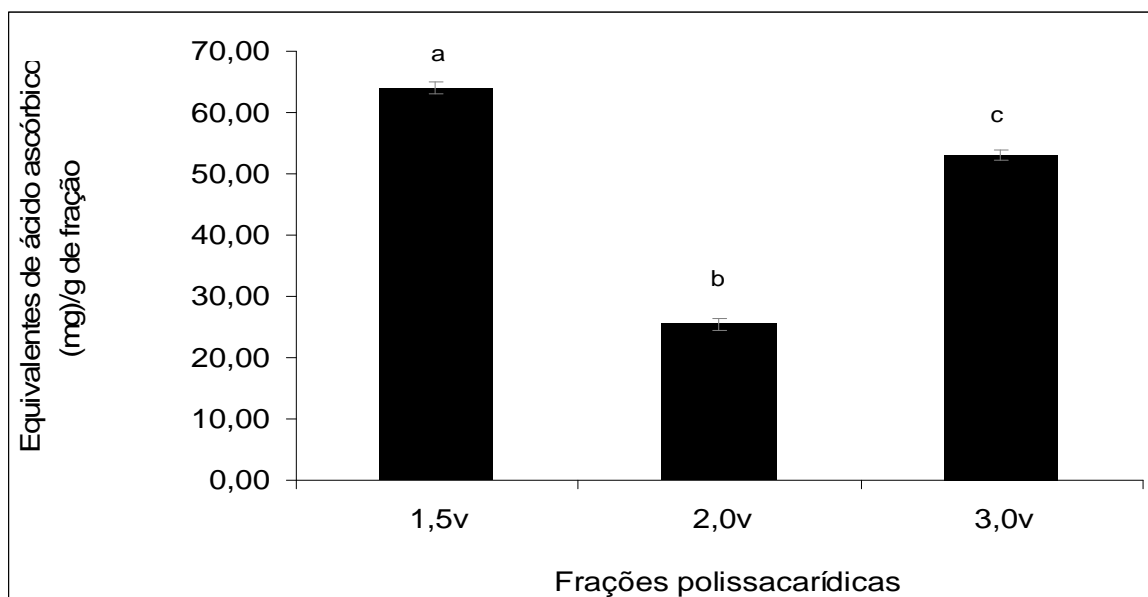
Frações	Concentração (mg/mL)	Ensaio	
		aPTT (s)	PT (s)
Controle		25,9 ± 2,2	11,2 ± 1,9
F1,5v	0,1 mg/mL	27,3 ± 3,2	11,4 ± 0,7
	1,0 mg/mL	26,9 ± 0,4	10,4 ± 1,0
	2,0 mg/mL	27,1 ± 3,8	10,8 ± 1,5
F2,0v	0,1 mg/mL	28,4 ± 1,7	11,8 ± 0,9
	1,0 mg/mL	26,3 ± 2,5	12,1 ± 2,7
	2,0 mg/mL	26,1 ± 2,1	11,4 ± 2,3
F3,0v	0,1 mg/mL	28,9 ± 4,8	11,0 ± 3,0
	1,0 mg/mL	27,0 ± 3,4	10,3 ± 4,1
	2,0 mg/mL	25,4 ± 2,7	10,7 ± 1,9
Heparina não fracionada	0,001 mg/mL	>240	>120
Clexane	0,001 mg/mL	66,2 ± 1,8	31,4 ± 0,7

### 3.6. Atividade antioxidante dos polissacarídeos sulfatados extraídos da alga *G. caudata*.

#### 3.6.1. Ensaio de Capacidade antioxidante total (CAT).

Como as frações não apresentaram atividade anticoagulante, resolveu-se avaliar as frações polissacarídicas frente a outros testes de avaliação de atividades biológicas. Assim as frações foram avaliadas com relação as suas atividades antioxidantes.

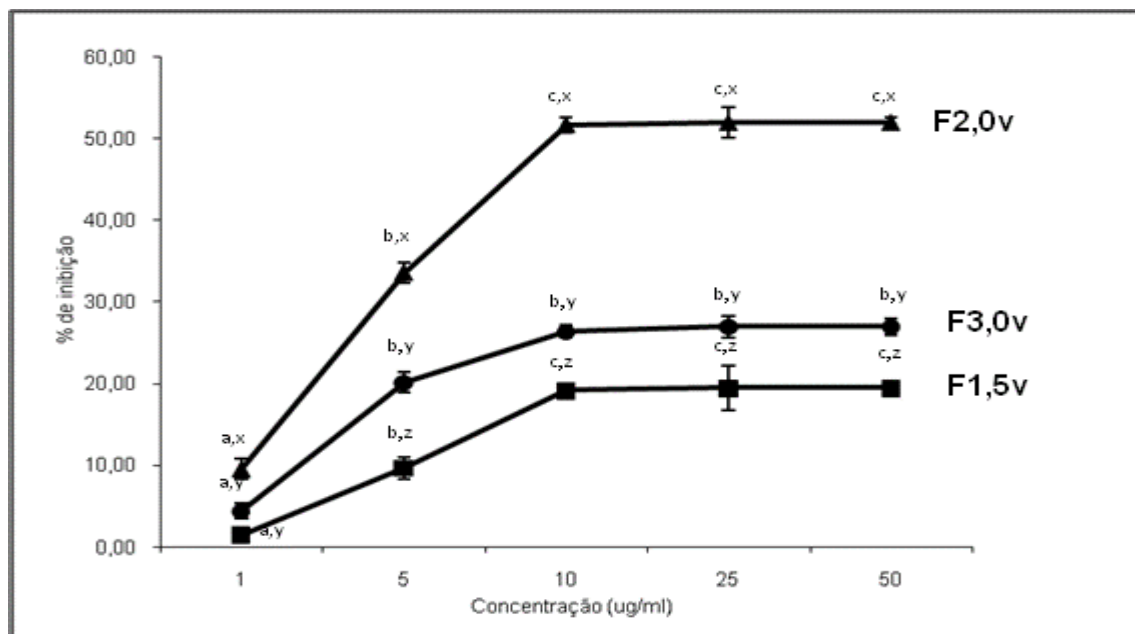
O primeiro ensaio avaliou a capacidade antioxidante total das frações, mostrada na Figura 07. A fração F1,5v apresentou a maior atividade antioxidante para o ensaio de CAT com atividade equivalente de 63,9 mg de ácido ascórbico/g de fração. Este valor foi significativamente superior ( $P < 0,01$ ) ao encontrado para F2,0v e F3,0v que apresentaram atividade equivalente de 25,4 e 53,0 mg de ácido ascórbico/g de fração, respectivamente.



**Figura 07. Capacidade antioxidante total das frações polissacarídicas de *G. caudata*.** Os resultados são expressos como equivalentes de ácido ascórbico. <sup>a,b,c</sup> Letras distintas são significativamente diferentes para  $P < 0,01$ .

### 3.6.2. Ensaio de seqüestro de radicais superóxido.

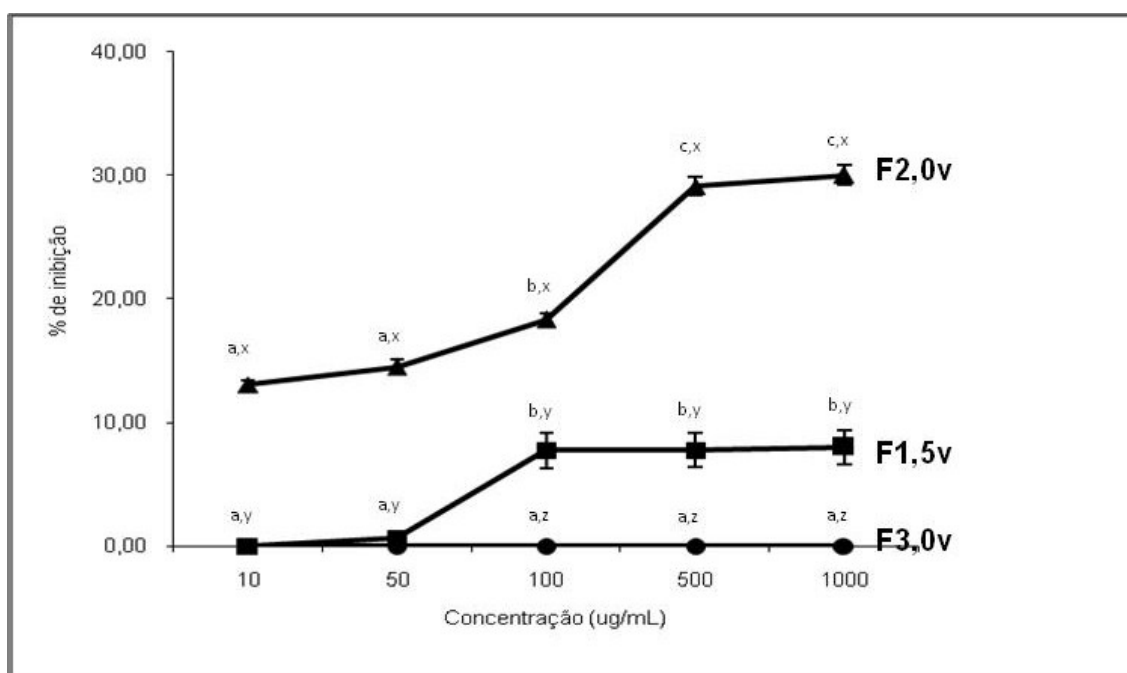
No ensaio de seqüestro de radicais superóxido, todas as frações polissacarídicas da alga *G. caudata* apresentaram atividade moderada em baixas concentrações, atingindo um platô de atividade com apenas 10 µg/mL (Figura 08). F2,0v mostrou a melhor atividade seqüestradora atingindo 52% de inibição dos radicais superóxido, enquanto F1,5v e F3,0v atingiram apenas 19,5% e 27,0% de inibição, respectivamente.



**Figura 08. Atividade seqüestradora de radicais superóxido das frações polissacarídicas de *G. caudata*.** Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0.01$ ) entre variadas concentrações de uma fração polissacarídica individual. <sup>x,y,z</sup> Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0.01$ ) entre concentrações semelhantes de diferentes frações polissacarídicas da alga *G. caudata*.

### 3.6.3. Ensaio de seqüestro de radicais hidroxilas.

A capacidade dos polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata* em seqüestrar os radicais hidroxilas foi avaliada como descrito em Materiais e Métodos. A Figura 09 sumariza os resultados obtidos. F3,0v não apresentou atividade de seqüestro de radicais hidroxila até a concentração testada de 1 mg/mL. Já F2,0v mostrou moderado efeito inibitório com cerca de 30% de seqüestro de radicais. F1,5v apresentou apenas 8% de inibição dos radicais hidroxila na concentração de 100 µg/mL.

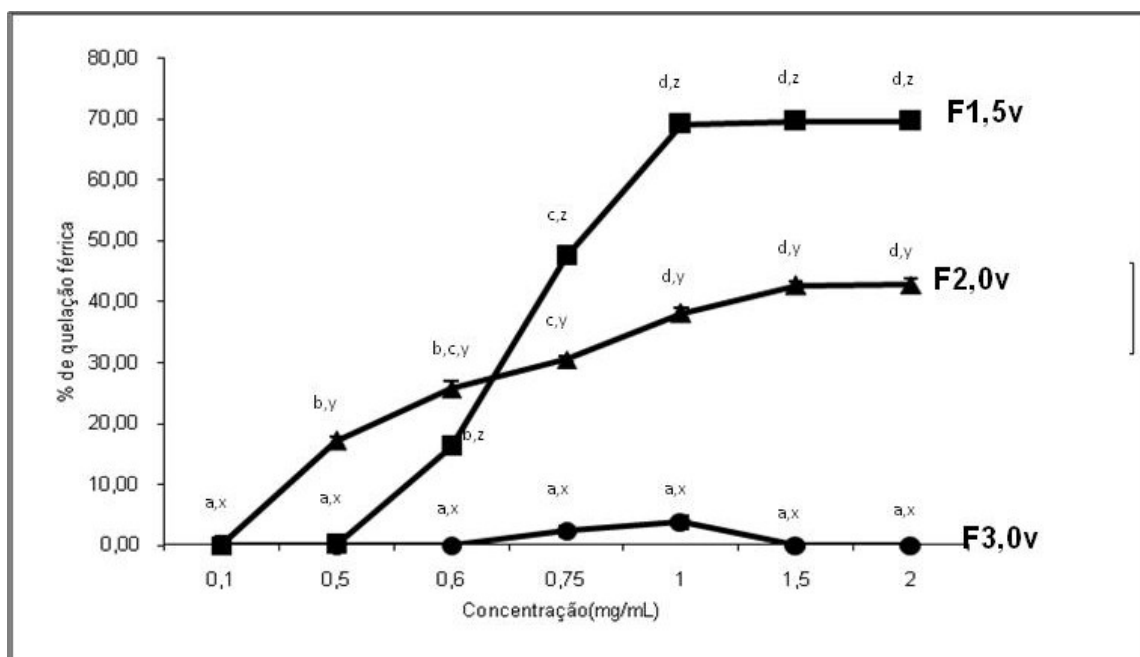


**Figura 09. Atividade sequestradora de radicais hidroxila das frações polissacarídicas de *G. caudata*.** Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre variadas concentrações de uma fração polissacarídica individual. <sup>x,y,z</sup> Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre concentrações semelhantes de diferentes frações polissacarídicas da alga *G. caudata*.

### 3.6.4. Ensaio de Quelação férrica.

Dentre os metais de transição, o ferro é conhecido como o mais importante pró-oxidante participando principalmente da reação que forma os radicais hidroxila. A ferrozina, reagente utilizado neste ensaio, interage com o cloreto de ferro oxidando-o. Os polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata* foram avaliados quanto a capacidade de quelar o cloreto de ferro (Figura 10).

Apenas F3,0v não apresentou atividade quelante de ferro nas concentrações testadas. Por outro lado, F1,5v mostrou excelente atividade com cerca de 70% de quelação férrica na concentração de 1,0 mg/mL. Por fim, F2,0v, com a mesma concentração citada acima, apresentou quelação férrica de 38%, o equivalente a uma atividade 1,8 vezes mais baixa do que aquela vista para F1,5v.



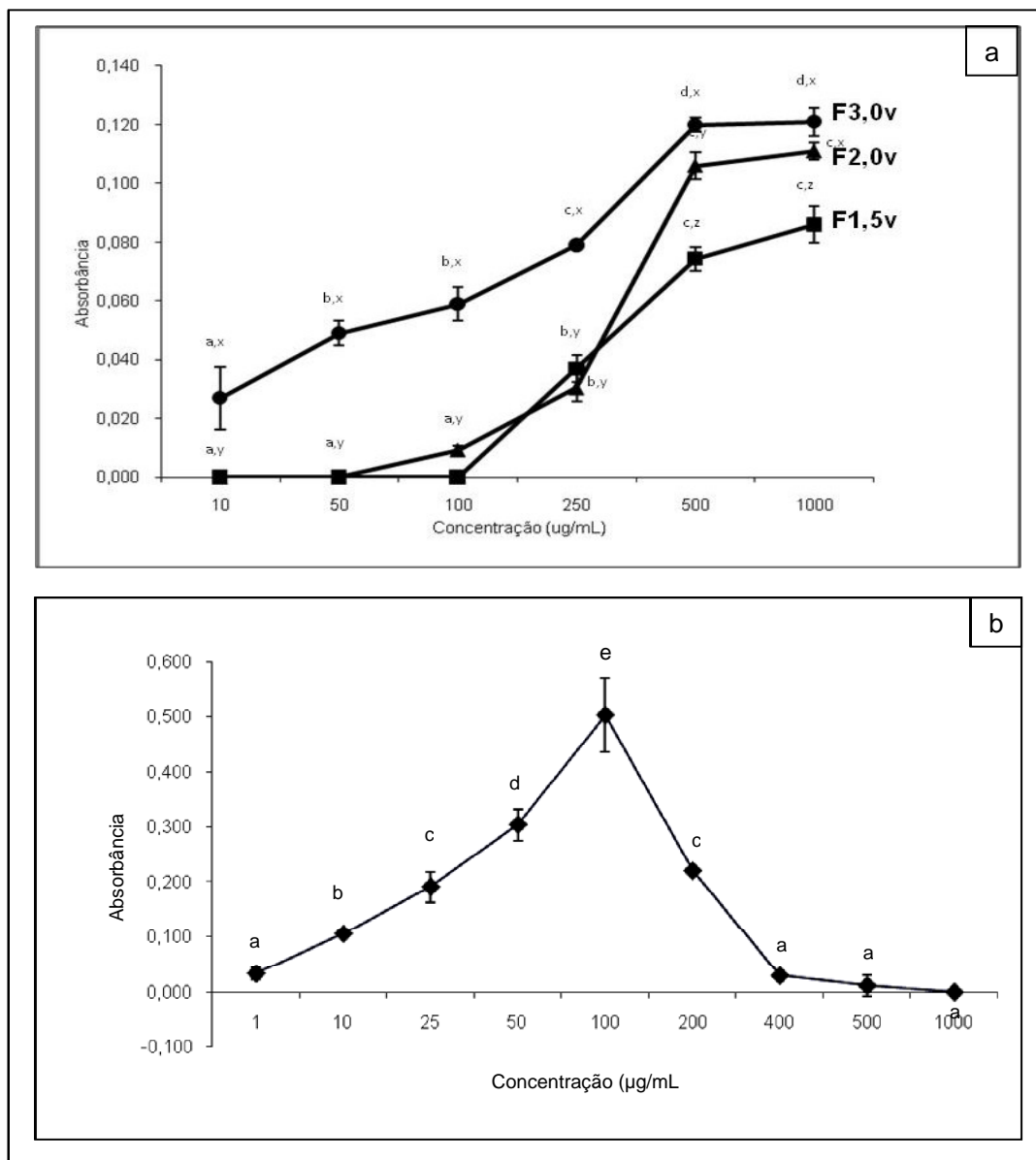
**Figura 10. Atividade de Quelação férrica das frações polissacarídicas de *G. caudata*.** Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a,b,c,d</sup> Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0.01$ ) entre variadas concentrações de uma fração polissacarídica individual. <sup>x,y,z</sup> Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0.01$ ) entre concentrações semelhantes de diferentes frações polissacarídicas da alga *G. caudata*.



### 3.6.5. Ensaio de Poder redutor.

O ensaio de poder redutor dos polissacarídeos sulfatados de *G. caudata* foi avaliado através do monitoramento da formação do azul de prussian. Como pode-se visualizar na Figura 11 todas as frações apresentaram atividade dose-dependente. A absorvância de F1,5v, F2,0v e F3,0v, na concentração de 1 mg/mL, foi de 0,086, 0,111 e 0,123, respectivamente.

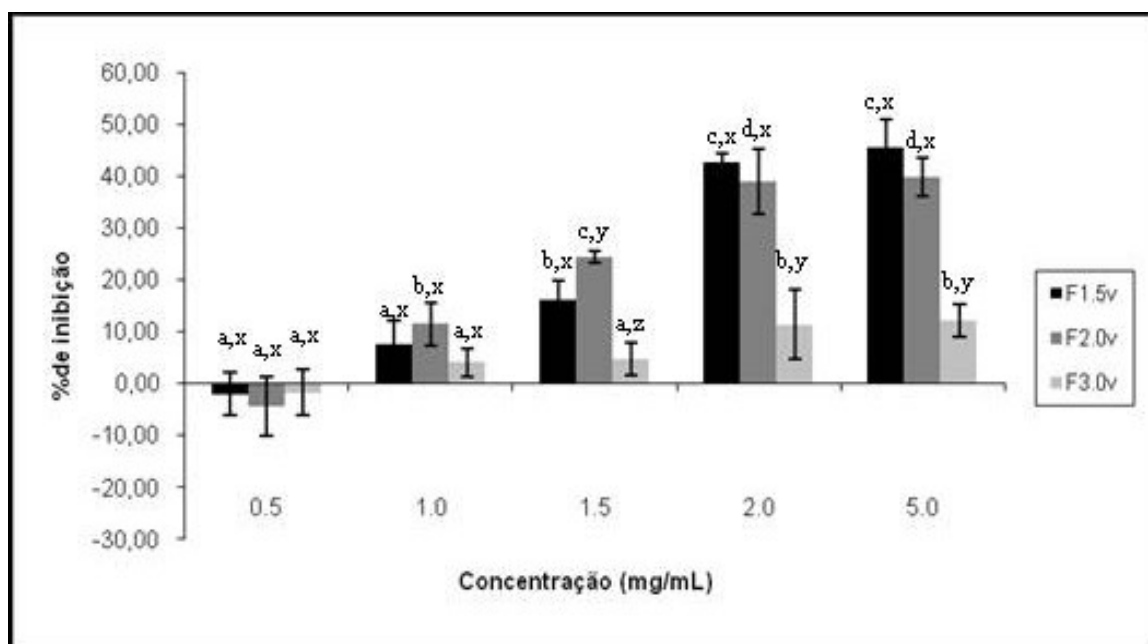
A vitamina C, usada como controle positivo neste experimento, apresentou excelente atividade redutora atingindo absorvância de 0,500 na concentração de 0,1 mg/mL, aproximadamente 7,8 vezes maior do que F3,0v nessa mesma concentração. Entretanto, ao contrário dos polissacarídeos de *G. caudata*, a vitamina C apresenta uma queda de sua atividade em concentrações superiores, chegando a perdê-la totalmente a 1 mg/mL (Figura 12).



**Figura 11. Ensaio de Poder redutor.** a) Frações polissacarídicas de *G. caudata*. b) Ácido ascórbico. Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a,b,c,d</sup> Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0.01$ ) entre variadas concentrações de uma fração polissacarídica individual. <sup>x,y,z</sup> Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0.01$ ) entre concentrações semelhantes de diferentes frações polissacarídicas da alga *G. caudata*.

### 3.7. Atividade antiproliferativa dos polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata*.

Outra atividade biológica avaliada das frações polissacarídicas de *G. caudata* foi seu efeito frente a células tumorais HeLa. Os dados mostraram que todas as frações polissacarídicas da alga *G. caudata* apresentaram atividade antiproliferativa dose-dependente (Figura 13). As frações F1,5v e F2,0v apresentaram as atividades mais significantes, inibindo a proliferação de células HeLa em torno de 42,7% e 37,0%, respectivamente, na concentração de 2,0 mg/mL. F3,0v apenas mostrou moderada atividade antiproliferativa nas concentrações testadas, com um máximo de inibição de 12% à 2 mg/mL.



**Figura 12. Atividade antiproliferativa dos polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata*.** <sup>a,b,c,d</sup> Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre variadas concentrações de uma fração polissacarídica individual de *G. caudata*. <sup>x,y,z</sup> Letras distintas indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre concentrações semelhantes de diferentes frações polissacarídicas da alga *G. caudata*.

#### 4 – DISCUSSÃO

Neste trabalho, para a obtenção de polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Gracilaria caudata* utilizou-se uma metodologia de extração já estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa (Figura 03). Essa metodologia permite a separação de diferentes populações de polissacarídeos sulfatados de acordo com a interação destes com solventes polares. Assim obteve-se três frações polissacarídicas denominadas de F1,5v; F2,0v e F3,0v, de acordo com o volume de acetona adicionado no processo de fracionamento.

Para verificar a presença de polissacarídeos sulfatados, as frações polissacarídicas foram submetidas à técnica de eletroforese em gel de agarose em tampão PDA. Neste sistema, os polissacarídeos interagem com a diamina em função da conformação e distribuição dos grupamentos sulfatos, sendo que, aqueles polissacarídeos que mais interagem com a diamina, passam a apresentar uma menor mobilidade eletroforética, e aqueles que apresentam menor interação mostram maior mobilidade. A presença de bandas eletroforéticas em diferentes frações com migrações semelhantes é um indicativo de que estas bandas podem representar a mesma população de polissacarídeos, assim como, migrações eletroforéticas distintas representam populações polissacarídicas diferentes (DIETRICH; DIETRICH, 1976).

Estudos que utilizaram a metodologia aplicada nesse trabalho têm demonstrado que cada espécie de alga marinha avaliada apresenta em sua constituição pelo menos duas populações de polissacarídeos sulfatados (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004; ALVES, 2000; BARROSO *et al.*, 2008; FARIAS *et al.*, 2008; FARIAS, 2005; FARIAS, 2006; LEITE *et al.*, 1998; MARQUES, 2008; QUEIROZ., 2003; ROCHA *et al.*, 2005). A alga marrom *Spatoglossum schröderi* apresentou três populações polissacarídicas classificadas em fucana A, B e C de acordo com a mobilidade eletroforética (LEITE, *et al.*, 1998). Portanto o fato de *G. caudata* apresentar pelo menos duas populações polissacarídicas: uma de menor outra de maior mobilidade eletroforética (Figura 05), não foi um resultado muito surpreendente. O polissacarídeo sulfatado de menor mobilidade foi encontrado nas frações F1,5v e F2,0v, enquanto o de maior mobilidade encontra-se na F3,0v.

Com relação às análises químicas, a fração F1,5v apresentou em sua constituição aproximadamente o dobro do teor de açúcares totais em comparação

com as demais frações. Já para o teor de sulfato, F2,0v apresentou o maior percentual com 6%, seguida de F1,5v e F3,0v com 4,5% e 3,0% de sulfato, respectivamente (Tabela IV). Esses dados revelam que todas as frações polissacarídicas de *G. caudata* possuem características estruturais levemente distintas, apesar da eletroforese em gel agarose mostrar que as frações F1,5v e F2,0v apresentam o mesmo perfil eletroforético. Um resultado semelhante foi encontrado para polissacarídeos sulfatados da alga *Codium isthmocladum*, denominadas SG1 e SG2, que mostraram estruturas distintas, apesar de apresentarem perfis eletroforéticos semelhantes (FARIAS, *et al.*, 2008; FARIAS, 2005; FARIAS, 2006).

Os polissacarídeos extraídos de algas podem apresentar uma grande variação quando se diz respeito ao teor de contaminação protéica. Esta variação pode ocorrer devido a uma gama de fatores, dentre eles destaca-se a metodologia de extração utilizada, a espécie de alga e a sazonalidade. A contaminação protéica de *G. caudata* variou de 0,7% a 2,0% (Tabela IV) que foi considerada baixa. Valores baixos de contaminação protéica se mostraram uma constância quando se usa a metodologia de purificação de polissacarídeos usada neste trabalho, independente da espécie de alga, bem como, da classe, pois tanto algas marrons (ALBUQUERQUE, *et al.*, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2005) como algas verdes (FARIAS, *et al.*, 2008; FARIAS, 2005; FARIAS, 2006) apresentaram baixa contaminação protéica. Esses dados indicam que a utilização de um passo que promova a desnaturação/degradação de proteínas nos passos iniciais de extração de polissacarídeos, como proteólise, são essenciais para se obter baixos índices de contaminação protéica.

Após a cromatografia descendente em papel em tampão Acetato de etila: Piridina: Água pode-se observar a presença de quatro monossacarídeos distribuídos de maneira não-uniforme em todas as frações polissacarídicas: Galactose, manose, glicose e xilose (Figura 06; Tabela V). A presença de quatro monossacarídeos indica uma heterogeneidade muito grande para os polissacarídeos sulfatados de *G. caudata*, principalmente, quando se compara com a estrutura de várias homogalactanas sulfatadas que foram extraídas de outras algas vermelhas (FARIAS *et al.*, 2000; KOLENDER *et al.*, 1997; PEREIRA; MELO; MOURAO, 2002). Contudo, essa heterogeneidade não é uma exclusividade de *G. caudata*, polissacarídeos de outras algas vermelhas demonstraram composição semelhante

(CASES; STORTZ; CEREZO, 1994; ESTEVEZ; CIANCIA; CEREZO, 2000), como por exemplo, as algas *Kappaphycus alvarezii* (ESTEVEZ; CIANCIA; CEREZO, 2004) e *Acanthophora spicifera* (DUARTE *et al.*, 2004) que apresentaram em sua constituição um polissacarídeo sulfatado composto de unidades centrais de  $\alpha$ -L-galactose e  $\beta$ -D-galactose substituídas por unidades de  $\beta$ -D-xilopirranose e D-glucopirranose.

A atividade anticoagulante é a atividade mais bem caracterizada para os polissacarídeos de algas marinhas (ALBUQUERQUE, *et al.*, 2004; CHEVOLOT *et al.*, 1999; NISHINO *et al.*, 1991; SEN *et al.*, 1994). É mensurada principalmente através da utilização de kits comerciais de aPTT e PT que avaliam a via intrínseca e extrínseca da coagulação, respectivamente. Até a concentração de 2 mg/mL nenhuma das frações polissacarídicas de *G. caudata* apresentaram atividade anticoagulante para nenhum dos testes mencionados acima, indicando ausência de potencial anticoagulante (Tabela VI).

Diversos trabalhos demonstram que a atividade anticoagulante não é meramente uma conseqüência de densidade de cargas, mas provavelmente, este efeito depende da presença de regiões com variáveis padrões de sulfatação nos polissacarídeos sulfatados (CHEVOLOT, *et al.*, 1999; FARIAS, *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2005; PEREIRA; MELO; MOURAO, 2002; ROCHA *et al.*, 2006). Portanto, apesar dos polissacarídeos sulfatados de *G. caudata* apresentarem sulfato em sua constituição, eles, provavelmente, não apresentam uma estrutura favorável à interação destes com proteínas envolvidas no processo de coagulação e, portanto não apresentam atividade anticoagulante. Portanto, decidiu-se avaliar a atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados de *G. caudata* para outro ensaio biológico, a atividade antioxidante.

Recentemente, vários polissacarídeos sulfatados de algas marinhas têm sido descritos como possuidores de atividade antioxidante (QI *et al.*, 2005; RASMUSSEN; MORRISSEY, 2007; WANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2003a; ZHANG *et al.*, 2003b). Este potencial antioxidante pode ser explicado pelo fato das algas marinhas ocuparem em sua maioria habitats em região intertidal (LITTLER; MURRAY, 1974; LUBCHENCO, 1978). Logo, dependendo da época do ano, profundidade ou até mesmo turbidez da água, as algas marinhas são expostas a uma grande variedade de radiação, em especial UV-A (280-320 nm) e UV-B (320-400), que leva a danos em biomoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, além da formação

exacerbada de radicais livres, podendo levar a destruição das células (CUZZOCREA *et al.*, 2001; YUAN; WALSH, 2006). Conseqüentemente, esses organismos têm desenvolvido inúmeros mecanismos de defesa endógena para o combate dos efeitos deletérios da radiação ultravioleta, em especial a produção de moléculas que atuem como antioxidantes no seqüestro dos radicais livres formados (AGUILERA *et al.*, 2002; HOYER *et al.*, 2001; HOYER; KARSTEN; WIENCKE, 2002).

O teste de Atividade antioxidante total (CAT) avalia o potencial antioxidante através da formação do complexo fosfato-molibdato observado pela mudança de coloração de amarelo para roxo-azulado (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). CAT é expressa como o número de equivalentes de ácido ascórbico (mg por cada grama de fração polissacarídica. A fração F1,5v apresentou atividade equivalente de 63,9 mg de ácido ascórbico/g de fração, sendo a mais potente fração polissacarídica da alga *G. caudata*. Por outro lado, F2,0v apresentou atividade aproximadamente 2,5 vezes menor (Figura 07). Este resultado mostra que os polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata* possui potencial antioxidante, o que levou a realização de outros ensaios antioxidantes que auxiliem na descoberta dos seus possíveis mecanismos antioxidantes.

A fração F2,0v, apesar de ter mostrado a menor atividade antioxidante total, foi a única fração a apresentar considerável inibição no ensaio de seqüestro de radicais superóxido com 52% de na concentração de apenas 10 µg/mL (Figura 08). Por outro lado, as frações que apresentaram maior atividade antioxidante total (F1,5v e F3,0v) mostraram pouca eficiência no seqüestro de radicais superóxido, mostrando que provavelmente, estas frações desempenham atividade antioxidante através de outros mecanismos. Alguns trabalhos mostram que o seqüestro de radicais superóxido pelos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas é dependente do teor de sulfato, ou seja, quanto mais sulfatado o polissacarídeo maior é a sua capacidade de seqüestro de radicais superóxido (DE SOUZA *et al.*, 2007; WANG, *et al.*, 2008; ZHANG, *et al.*, 2003b). Esses dados corroboram com os nossos resultados, já que as frações polissacarídicas de *G. caudata* mostraram atividade em uma ordem descendente de F2,0v > F1,5v > F3,0v, a mesma ordem da razão sulfato/açúcares totais (Tabela IV; Figura 08).

Os polissacarídeos de *G. caudata* foram avaliados para a atividade seqüestradora de radical hidroxila, que é visto como o mais reativo dos radicais livres em condições biológicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A fração F2,0v

apresentou a atividade seqüestradora de radicais hidroxila mais potente, com 30% de inibição à 0,5 mg/mL. Adicionalmente, não foi encontrada atividade para F3,0v, além de baixíssima atividade para F1,5v (Figura 09). Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas provavelmente não apresentam atividade antioxidante através deste mecanismo, já que existe apenas um único relato de polissacarídeo sulfatado de alga marinha com atividade seqüestradora de radical hidroxila considerável, trata-se de uma fucana extraída da alga *Laminaria japonica*, que necessitou de uma concentração de 2,5 mg/mL para inibir cerca de 90% dos radicais formados (WANG, *et al.*, 2008). Por outro lado, o radical hidroxila necessita de poucos milissegundos para reagir com moléculas biológicas, o que torna quase inviável o combate deste após sua formação pelo organismo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Portanto, tem sido dada muito mais atenção a compostos que impedem a formação do radical hidroxila do que aqueles que promovem o seu seqüestro, dentre estes se destaca o íon ferro, que reagindo com o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), numa reação conhecida como reação de Fenton, é responsável pela maior parte do radical hidroxila nos sistemas biológicos (AUST; MILLER, 1991; HALLIWELL B; GUTTERIDGE, 1986).

A fração F1,5v, Assim como no ensaio de capacidade antioxidante total, apresentou a melhor atividade quelante de íon ferro comparada com as demais frações, com 70% de inibição férrica na concentração de 1 mg/mL. A fração F2,0v apresentou atividade quelante de 40% enquanto F3,0v não mostrou nenhuma atividade. A atividade quelante de íons ferro de F1,5v é bastante superior aquelas atividades encontradas na literatura para polissacarídeos sulfatados naturais de algas marinhas (QI, *et al.*, 2005; QI *et al.*, 2006; WANG, *et al.*, 2008). Esse achado é extremamente interessante, já que alguns trabalhos mostram que, para compostos que são utilizados na terapia antioxidante, dentre os vários mecanismos de ação considerados essenciais, destaca-se o mecanismo de quelação de traços de íons ferro que catalisam a reação de formação de radical hidroxila (CUZZOCREA, *et al.*, 2001; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Desta forma, F1,5v aparece como um promissor fármaco na terapia antioxidante, tanto para uso farmacológico, bem como para a utilização em indústrias de cosméticos e alimentos.

Para o ensaio do poder redutor (Figura 11), todas as frações polissacarídicas de *G. caudata* apresentaram atividade dose-dependente. Até o presente momento, nenhum trabalho mostrando o poder redutor de polissacarídeos sulfatados de algas



vermelhas foi encontrado na literatura, contudo os dados aqui apresentados foram semelhantes aos encontrados para fucanas purificadas da alga *Laminaria japonica* (WANG, *et al.*, 2008), porém, como ocorreu neste trabalho, não foi encontrada nenhuma relação estrutural dos polissacarídeos sulfatados com este tipo de ensaio.

Os resultados aqui relatados foram bastante interessantes, pois indicam que *G. caudata* sintetiza polissacarídeos sulfatados com diferentes mecanismos antioxidante. Apesar de sua potência antioxidante não ter sido tão alta em alguns ensaios, deve ser a soma dos efeitos individuais desses polímeros que é utilizada como uma estratégia de defesa da alga. Esta proporcionaria uma defesa mais eficiente frente aos radicais livres em detrimento da síntese de polissacarídeos com alta atividade antioxidante, mas que agiram apenas via um mecanismo.

Compostos antioxidantes também têm sido relatados como possuidores de atividade antiproliferativa frente a linhagens celulares tumorais (ATHUKORALA; KIM; JEON, 2006; SUN *et al.*, 2002; YE *et al.*, 2008). Frente a linhagem celular tumoral HeLa, as frações F1,5v e F2,0 de *G. caudata* apresentaram atividade antiproliferativa semelhante na concentração de 2 mg/mL. Por outro lado, F3,0v apresentou atividade de apenas 14,5% (Figura 09). Assim como nos demais trabalhos encontrados na literatura (CHU *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2002; MEYERS *et al.*, 2003; SUN, *et al.*, 2002; YE, *et al.*, 2008; YUAN; WALSH, 2006), estes resultados também não mostram nenhuma correlação direta entre as atividades antioxidante e antiproliferativa. Portanto, estudos mais aprofundados que ajudem a identificar os possíveis mecanismos de ação antiproliferativa dos polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata* se fazem necessários, já que polissacarídeos sulfatados de algas marinhas podem apresentar atividade antitumoral através de diversos mecanismos, tais como, bloqueio do ciclo celular (JI; GAO; ZHANG, 2004; RIOU *et al.*, 1996), ativação de diferentes vias de apoptose, especialmente via das caspases (AISA *et al.*, 2005; TERUYA *et al.*, 2007) e inibição da adesão celular à matriz extracelular (ROCHA *et al.*, 2001).

Por fim, estudos adicionais estão sendo realizados na tentativa de elucidar a relação entre a estrutura e atividade antioxidante dos polissacarídeos sulfatados da alga *Gracilaria caudata*, bem como a possível correlação entre as atividades antioxidante e antiproliferativa, os quais, certamente, ajudarão no desenvolvimento de um novo agente terapêutico.

## 5 – CONCLUSÕES

Através do fracionamento com volumes crescentes de acetona foram obtidas três frações polissacarídicas da alga vermelha *Gracilaria caudata*: F1,5v, F2,0v e F3,0v;

As frações polissacarídicas da alga *G. caudata* são constituídos de galactose, manose, xilose, glicose e sulfato, além de apresentarem baixa contaminação por proteínas e compostos fenólicos;

Nenhuma fração polissacarídica apresentou atividade anticoagulante mensurável até a concentração de 2 mg/mL;

As frações polissacarídicas de *G. caudata* apresentaram atividade para os diferentes ensaios antioxidantes;

O seqüestro de radicais superóxido e a quelação férrica aparecem como os principais mecanismos antioxidante da fração F2,0v;

A fração F3,0v apresentou atividade antioxidante para os ensaios de seqüestro de radicais superóxido e poder redutor;

A fração F1,5v apresentou a maior atividade de quelação férrica já relatada para polissacarídeos sulfatados naturais, o que a torna um promissor fármaco na terapia antioxidante;

Os polissacarídeos sulfatados da alga *G. caudata*, em especial, F1,5v e F2,0v, mostraram potencial antiproliferativo frente a linhagem celular tumoral de cólon uterino (HeLa).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, Y.; SMITH, S. L.; SCHWARTZ-ALBIEZ, R.; ANDREWS, K. T. Carrageenans inhibit the in vitro growth of *Plasmodium falciparum* and cytoadhesion to CD36. **Parasitol Res.** v. 97, n. 4, p. 290-294, 2005.
- AGUILERA, J.; BISCHOF, K.; KARSTEN, U.; HANELT, D.; WIENCKE, C. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. **Marine Biology** v. 140, n., p. 12, 2002.
- AISA, Y.; MIYAKAWA, Y.; NAKAZATO, T.; SHIBATA, H.; SAITO, K.; IKEDA, Y.; KIZAKI, M. Fucoïdan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. **Am J Hematol.** v. 78, n. 1, p. 7-14, 2005.
- 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.** v. 37, n. 2, p. 167-171, 2004.
- ALVES, L. G. Extração de polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha *Sargassum vulgare*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2000.
- ATHUKORALA, Y.; KIM, K. N.; JEON, Y. J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food Chem Toxicol.** v. 44, n. 7, p. 1065-1074, 2006.
- AUST, S. D.; MILLER, D. M., Role of iron in oxygen radical generation and reactions. In: GS, P.; MJ, V.; MA, D. **New horizons in molecular toxicology: a symposium.** Research Laboratories Symposium/Molecular Toxicology: 1991. p.
- BALAJI RAGHAVENDRA RAO, H.; SATHIVEL, A.; DEVAKI, T. Antihepatotoxic nature of *Ulva reticulata* (Chlorophyceae) on acetaminophen-induced hepatotoxicity in experimental rats. **J Med Food.** v. 7, n. 4, p. 495-497, 2004.
- BARROSO, E. M. A.; COSTA, L. S.; MEDEIROS, M. G. L.; CORDEIRO, S. L.; COSTA, M. S. S. P.; FRANCO, C. R.; NADER, H. B.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O.; A non-anticoagulant heterofucan has antithrombotic activity in vivo. In **Planta Med.** 2008.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem.** v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- BILAN, M. I.; VINOGRADOVA, E. V.; SHASHKOV, A. S.; USOV, A. I. Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the Pacific green alga *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta). **Carbohydr Res.** v. 342, n. 3-4, p. 586-596, 2007.

- BLONDIN, C.; FISCHER, E.; BOISSON-VIDAL, C.; KAZATCHKINE, M. D.; JOZEFONVICZ, J. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed. **Mol Immunol.** v. 31, n. 4, p. 247-253, 1994.
- BOISSON-VIDAL, C.; ZEMANI, F.; CALIGIURI, G.; GALY-FAUROUX, I.; COLLIEC-JOUAULT, S.; HELLEY, D.; FISCHER, A. M. Neoangiogenesis induced by progenitor endothelial cells: effect of fucoidan from marine algae. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.** v. 5, n. 1, p. 67-77, 2007.
- CARDOSO, M. A.; NOSEDA, M. D.; FUJII, M. T.; ZIBETTI, R. G.; DUARTE, M. E. Sulfated xylomannans isolated from red seaweeds *Chondrophyucus papillosus* and *C. flagelliferus* (Cerariales) from Brazil. **Carbohydr Res.** v. 342, n. 18, p. 2766-2775, 2007.
- CARLUCCI, M. J.; SCOLARO, L. A.; DAMONTE, E. B. Inhibitory action of natural carrageenans on Herpes simplex virus infection of mouse astrocytes. **Chemotherapy.** v. 45, n. 6, p. 429-436, 1999.
- CASES, M. R.; STORTZ, C. A.; CERESO, A. S. Structure of the 'corallinans'--sulfated xylogalactans from *Corallina officinalis*. **Int J Biol Macromol.** v. 16, n. 2, p. 93-97, 1994.
- CHARGAFF, E.; BANCROFT, F. W.; STANLEY-BROWN, M. Studies on the chemistry of blood coagulation. I. The measurement of the inhibition of blood clotting. Methods and units. **J. Biol. Chem.** v. 115, n., p. 6, 1936.
- 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.** v. 319, n. 1-4, p. 154-165, 1999.
- CHEVOLOT, L.; FOUCAULT, A.; COLLIEC-JOUAULT, S.; RATISKOL, J.; SINQUIN, C. Improvement purification of sulfated oligofucan by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography. **J Chromatogr A.** v. 869, n. 1-2, p. 353-361, 2000.
- CHU, Y. F.; SUN, J.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. **J Agric Food Chem.** v. 50, n. 23, p. 6910-6916, 2002.
- CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; VIZCARGUENAGA, M. I.; KASULIN, L.; DE DIOS, A.; ESTEVEZ, J. M.; CERESO, A. S. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. **Int J Biol Macromol.** v. 41, n. 5, p. 641-649, 2007.
- COOMBE, D. R.; PARISH, C. R.; RAMSHAW, I. A.; SNOWDEN, J. M. Analysis of the inhibition of tumour metastasis by sulphated polysaccharides. **Int J Cancer.** v. 39, n. 1, p. 82-88, 1987.

CUZZOCREA, S.; RILEY, D. P.; CAPUTI, A. P.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacol Rev.** v. 53, n. 1, p. 135-159, 2001.

DAMONTE, E.; NEYTS, J.; PUJOL, C. A.; SNOECK, R.; ANDREI, G.; IKEDA, S.; WITVROUW, M.; REYMEN, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M. C.; ET AL. Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochem Pharmacol.** v. 47, n. 12, p. 2187-2192, 1994.

DASGUPTAA, N.; DE, B. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study **Food Chemistry.** v. 101, n. 2, p. 4, 2007.

DE SOUZA, M. C. R.; MARQUES, C. T.; DORE, C. M. G.; DA SILVA, F. R. F.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **Journal of Applied Phycology.** v. 19, n. 2, p. 153-160, 2007.

DEACON-SMITH, R. A.; LEE-POTER, J. P.; ROGERS, D. J. Platelet aggregation in the presence of extracts of British marine algae. **Med Lab Sci.** v. 42, n. 4, p. 2, 1985.

DECKER, E. A.; WELCH, B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food?. **Journal of agricultural food chemistry.** v. 38, n., p. 4, 1990.

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

DOCTOR, V. M.; HILL, C.; JACKSON, G. J. Effect of fucoidan during activation of human plasminogen. **Thromb Res.** v. 79, n. 3, p. 237-247, 1995.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem J.** v. 84, n., p. 106-110, 1962.

DROZD, N. N.; TOLSTENKOV, A. S.; MAKAROV, V. A.; KUZNETSOVA, T. A.; BESEDNOVA, N. N.; SHEVCHENKO, N. M.; ZVYAGINTSEVA, T. N. Pharmacodynamic parameters of anticoagulants based on sulfated polysaccharides from marine algae. **Bull Exp Biol Med.** v. 142, n. 5, p. 591-593, 2006.

DUARTE, M. E.; CAUDURO, J. P.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; GONCALVES, A. G.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; CEREZO, A. S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydr Res.** v. 339, n. 2, p. 335-347, 2004.

ELLOUALI, M.; BOISSON-VIDAL, C.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. Antitumor activity of low molecular weight fucans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. **Anticancer Res.** v. 13, n. 6A, p. 2011-2019, 1993.

ELLOUALI, M.; BOISSON-VIDAL, C.; JOZEFONVISCZ, J. Antiproliferative effect and interaction of fucans with cells. **Colloids Surf B: Biointerfaces**. v. 2, n., p. 10, 1994.

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

ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A. S. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. **Carbohydr Res**. v. 339, n. 15, p. 2575-2592, 2004.

Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. In Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer.: Rio de Janeiro 2007; p 94.

FARIAS, E. H.; POMIN, V. H.; VALENTE, A. P.; NADER, H. B.; ROCHA, H. A.; MOURAO, P. A. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. **Glycobiology**. v. 18, n. 3, p. 250-259, 2008.

FARIAS, E. H. C. Análise comparativa da atividade anticoagulante de frações de polissacarídeos sulfatados das algas marinhas: *Caulerpa prolifera* e *Codium isthmocladum*. . UFRN, Natal, 2005.

FARIAS, E. H. C. Homogalactanas sulfatadas da alga *Codium isthmocladum* com atividade anticoagulante. Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

FARIAS, W. R.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURAO, P. A. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **J Biol Chem**. v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil** v. 43, n. 1, p. 8, 1997.

GHOSH, P.; ADHIKARI, U.; GHOSAL, P. K.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**. v. 65, n. 23, p. 3151-3157, 2004.

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**. v. 80, n. 4, p. 692-695, 1998.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem Biophys** v. 246, n., p. 14, 1986.



- HAROUN-BOUHEDJA, F.; ELLOUALI, M.; SINQUIN, C.; BOISSON-VIDAL, C. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. **Thromb Res.** v. 100, n. 5, p. 453-459, 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.** v. 1543, n. 1, p. 86-94, 2000.
- HAYASHI, T. Studies on evaluation of natural products for antiviral effects and their applications. **Yakugaku Zasshi.** v. 128, n. 1, p. 61-79, 2008.
- HEO, S. J.; PARK, E. J.; LEE, K. W.; JEON, Y. J. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. **Bioresour Technol.** v. 96, n. 14, p. 1613-1623, 2005.
- HOFFMAN, R. Carrageenans inhibit growth-factor binding. **Biochem J.** v. 289 ( Pt 2), n., p. 331-334, 1993.
- HOSHINO, T.; HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; HAMADA, J.; LEE, J. B.; SANKAWA, U. An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH. **Biol Pharm Bull.** v. 21, n. 7, p. 730-734, 1998.
- HOYER, K.; KARSTEN, U.; SAWALL, T.; WIENCKE, C. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. **Mar Ecol Prog Ser.** v. 211, n., p. 13, 2001.
- HOYER, K.; KARSTEN, U.; WIENCKE, C. Induction of sunscreen compounds in Antarctic macroalgae by different radiation conditions **Marine Biology** v. 141, n., p. 9, 2002.
- HUHEIHEL, M.; ISHANU, V.; TAL, J.; ARAD, S. M. Activity of *Porphyridium sp.* polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. **J Biochem Biophys Methods.** v. 50, n. 2-3, p. 189-200, 2002.
- JI, Y. B.; GAO, S. Y.; ZHANG, X. J. [Influence of *sargassum fusiforme* polysaccharide on apoptosis of tumor cells]. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.** v. 29, n. 3, p. 245-247, 2004.
- JURD, K. M.; ROGERS, D. J.; BLUNDEM, G.; MCLELLAN, D. S. Anticoagulant properties of sulfated polysaccharides and a proteoglycan from *Codium fragile* ssp. **J. appl. Phycol.** v., n., p., 1995a.
- JURD, K. M.; ROGERS, D. J.; BLUNDEN, G.; MCLELLAN, D. S. Anticoagulant properties of sulfated polysaccharides and a proteoglycan from *Codium fragile* ssp. **J. appl. Phycol.** v., n., p., 1995b.
- KAEFFER, B.; BENARD, C.; LAHAYE, M.; BLOTTIERE, H. M.; CHERBUT, C. Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells. **Planta Med.** v. 65, n. 6, p. 527-531, 1999.

- KIMURA, J. Activity anticoagulant in Polysaccharides sulfated from *Laminaria*. **Hokkai igabu zaschi**. v. 19, n., p. 10, 1941.
- KLOAREG, K.; QUATRANO, R. S. Cell walls of marine algae: structure and function. **Oceanog. Mar. Biol.** v. 26, n., p. 57, 1988.
- KOBAYASHI, Y. Papers from seaweeds--manufacture and applications of alginate fiber papers]. **Tanpakushitsu Kakusan Koso**. v. 31, n. 11, p. 1066-1077, 1986.
- KOLENDER, A. A.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S. The system of sulfated alpha-(1-->3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structures, antiherpetic and anticoagulant properties. **Carbohydr Res.** v. 304, n. 1, p. 53-60, 1997.
- LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**. v. 8, n. 6, p. 1765-1774, 2007.
- LEE, J. B.; HAYASHI, K.; MAEDA, M.; HAYASHI, T. Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae. **Planta Med.** v. 70, n. 9, p. 813-817, 2004.
- LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVA, L. F.; CHAVANTE, S. F.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Structure of a new fucan from the algae *spatoglossum schröderi*. **Plant science**. v. 132, n., p. 14, 1998a.
- LITTLER, M. M.; MURRAY, S. N. The primary productivity of marine macrophytes from a rocky intertidal community. **Marine Biology**. v. 27, n., p. 5, 1974.
- LIU, J. M.; HAROUN-BOUHEDJA, F.; BOISSON-VIDAL, C. Analysis of the in vitro inhibition of mammary adenocarcinoma cell adhesion by sulphated polysaccharides. **Anticancer Res.** v. 20, n. 5A, p. 3265-3271, 2000.
- LIU, M.; LI, X. Q.; WEBER, C.; LEE, C. Y.; BROWN, J.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. **J Agric Food Chem.** v. 50, n. 10, p. 2926-2930, 2002.
- LUBCHENCO, J. Plant Species Diversity in a Marine Intertidal Community: Importance of Herbivore Food Preference and Algal Competitive Abilities. **The American Naturalist**. v. 112, n., p. 23, 1978.
- MANDAL, P.; MATEU, C. G.; CHATTOPADHYAY, K.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. **Antivir Chem Chemother.** v. 18, n. 3, p. 153-162, 2007.
- MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). **Bioresour Technol.** v. 96, n. 3, p. 379-382, 2005.



MARQUES, C. T. Caracterização estrutural e ação de fucanas de *P. gymnospora* no processo inflamatório. . UFRN, Natal, 2007.

MARUYAMA, H.; TAMAUCHI, H.; IIZUKA, M.; NAKANO, T. The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls (Mekabu). **Planta Med.** v. 72, n. 15, p. 1415-1417, 2006.

MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BACIC, A.; LIAO, M.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **Int J Biol Macromol.** v. 28, n. 5, p. 395-399, 2001.

MATSUBARA, K.; MORI, M.; MATSUMOTO, H.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Antiangiogenic properties of a sulfated galactan isolated from a marine green alga, *Codium cylindricum*. . **Journal of Applied Phycology.** v. 15, n. 1, p. 4, 2003.

MATSUBARA, K.; XUE, C.; ZHAO, X.; MORI, M.; SUGAWARA, T.; HIRATA, T. Effects of middle molecular weight fucoidans on in vitro and ex vivo angiogenesis of endothelial cells. **Int J Mol Med.** v. 15, n. 4, p. 695-699, 2005.

MAURAY, S.; DE RAUCOURT, E.; TALBOT, J. C.; DACHARY-PRIGENT, J.; JOZEFOWICZ, M.; FISCHER, A. M. Mechanism of factor IXa inhibition by antithrombin in the presence of unfractionated and low molecular weight heparins and fucoidan. **Biochim Biophys Acta.** v. 1387, n. 1-2, p. 184-194, 1998.

MCHUGH, D. J., A guide to the seaweed industry. . In PAPERS, F. F. T., Ed. FAO: Rome, 2003; Vol. 441. , p 118.

MEDINA, M. B. Binding of collagen I to *Escherichia coli* 0157:H7 and inhibition by carrageenans. **Int J Food Microbiol.** v. 69, n. 3, p. 10, 2001.

MEYERS, K. J.; WATKINS, C. B.; PRITTS, M. P.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. **J Agric Food Chem.** v. 51, n. 23, p. 6887-6892, 2003.

MINHAS, K. S.; SIDHU, J. S.; MUDAHAR, G. S.; SINGH, A. K. Flow behavior characteristics of ice cream mix made with buffalo milk and various stabilizers. **Plant Foods Hum Nutr.** v. 57, n. 1, p. 25-40, 2002.

MINIX, R.; DOCTOR, V. M. Interaction of fucoidan with proteases and inhibitors of coagulation and fibrinolysis. **Thromb Res.** v. 87, n. 5, p. 419-429, 1997.

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

NADER, H. B.; PINHAL, M. A.; BAU, E. C.; CASTRO, R. A.; MEDEIROS, G. F.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L.; TRINDADE, E. S.; SHINJO, S. K.; ROCHA, H. A.O.; TERSARIOL, I. L.; MENDES, A.; DIETRICH, C. P. Development of new heparin-like compounds and other antithrombotic drugs and their interaction with vascular endothelial cells. **Braz J Med Biol Res.** v. 34, n. 6, p. 699-709, 2001.

- NAGAOKA, M.; SHIBATA, H.; KIMURA-TAKAGI, I.; HASHIMOTO, S.; AIYAMA, R.; UEYAMA, S.; YOKOKURA, T. Anti-ulcer effects and biological activities of polysaccharides from marine algae. **Biofactors**. v. 12, n. 1-4, p. 267-274, 2000.
- NAIK, V. R.; AGSHIKAR, N. V.; ABRAHAM, G. J.; SOLIMABI; KAMAT, S. Y.; REDDY, C. V. Comparison of Carrageenan from *Hypnea musciformis* Wulfen with other carrageenans. **Indian J Exp Biol**. v. 18, n. 6, p. 649-651, 1980.
- NISHINO, T.; AIZU, Y.; NAGUMO, T. Antithrombin activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Thromb Res**. v. 62, n. 6, p. 765-773, 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*. **Thromb Res**. v. 96, n. 1, p. 37-49, 1999.
- NISHINO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; NAGUMO, T. An anticoagulant fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Phytoc**. v. 30, n. 2, p. 535-539, 1991a.
- NISHINO, T.; NAGUMO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Carbohydr Res**. v. 211, n. 1, p. 77-90, 1991b.
- NISHINO, T.; YAMAUCHI, T.; HORIE, M.; NAGUMO, T.; SUZUKI, H. Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA. **Thromb Res**. v. 99, n. 6, p. 623-634, 2000.
- PENGZHAN, Y.; NING, L.; XIGUANG, L.; GEFEI, Z.; QUANBIN, Z.; PENGCHENG, L. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Pharmacol Res**. v. 48, n. 6, p. 543-549, 2003.
- PERCIVAL, E. G. V.; DOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **London: Academic Press**. v. 219, n., p., 1967.
- PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M.; MELO, M. R.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R.; MOURAO, P. A. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydr Res**. v. 340, n. 12, p. 2015-2023, 2005.
- PEREIRA, M. S.; MELO, F. R.; MOURAO, P. A. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? **Glycobiology**. v. 12, n. 10, p. 573-580, 2002.
- PRADO, H. J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M. C. Agarans from the red seaweed *Polysiphonia nigrescens* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Carbohydr Res**. v. 343, n. 4, p. 711-718, 2008.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex:

- specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem.** v. 269, n. 2, p. 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. **Int J Biol Macromol.** v. 37, n. 4, p. 195-199, 2005.
- QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; HU, R.; ZHANG, K.; LI, Z. In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Bioorg Med Chem Lett.** v. 16, n. 9, p. 2441-2445, 2006.
- QUEIROZ, K. C.; ASSIS, C. F.; MEDEIROS, V. P.; ROCHA, H. A. O.; AOYAMA, H.; FERREIRA, C. V.; LEITE, E. L. Cytotoxicity effect of algal polysaccharides on HL60 cells. **Biochemistry (Mosc).** v. 71, n. 12, p. 1312-1315, 2006.
- QUEIROZ., K. C. D. S. Polissacarídeos bioativos da alga marinha *lobophora variegata*. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2003.
- QUILLET, M. C. The chemical composition of brown algae I. The non esterified sugars. **Intern. Centre Natl. Sci. Paris.** v. 103, n., p. 12, 1961.
- RASMUSSEN, R. S.; MORRISSEY, M. T. Marine biotechnology for production of food ingredients. **Adv Food Nutr Res.** v. 52, n., p. 237-292, 2007.
- RIOU, D.; COLLIEC-JOUAULT, S.; PINCZON DU SEL, D.; BOSCH, S.; SIAVOSHIAN, S.; LE BERT, V.; TOMASONI, C.; SINQUIN, C.; DURAND, P.; ROUSSAKIS, C. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. **Anticancer Res.** v. 16, n. 3A, p. 1213-1218, 1996.
- ROCHA, H. A. O.; BEZERRA, L. C.; DE ALBUQUERQUE, I. R.; COSTA, L. S.; GUERRA, C. M.; DE 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 cells. **Planta Med.** v. 71, n. 4, p. 379-381, 2005a.
- ROCHA, H. A. O.; FRANCO, C. R.; TRINDADE, E. S.; CARVALHO, L. C.; 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 Res.** v. 34, n. 5, p. 621-626, 2001.
- ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L.; MEDEIROS, V. P.; LOPES, C. C.; NASCIMENTO, F. D.; TERSARIOL, I. L. S.; L.O., S.; NADER, H. B., Natural sulfated polysaccharides as antithrombotic compounds. Structural characteristics and effects on the coagulation cascade. In: VERLI, H. **Insights into carbohydrate structure and biological function.** Transworld research network: 2006. p. 19.
- ROCHA, H. A. O.; MORAES, F. A.; TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R.; TORQUATO, R. J.; VEIGA, S. S.; VALENTE, A. P.; MOURAO, P. A.; LEITE, E. L.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from

the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent? **J Biol Chem.** v. 280, n. 50, p. 41278-41288, 2005b.

RUPEREZ, P.; AHRAZEM, O.; LEAL, J. A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. **J Agric Food Chem.** v. 50, n. 4, p. 840-845, 2002.

SEN, A. K., SR.; DAS, A. K.; BANERJI, N.; SIDDHANTA, A. K.; MODY, K. H.; RAMAVAT, B. K.; CHAUHAN, V. D.; VEDASIROMONI, J. R.; GANGULY, D. K. A new sulfated polysaccharide with potent blood anti-coagulant activity from the red seaweed *Grateloupia indica*. **Int J Biol Macromol.** v. 16, n. 5, p. 279-280, 1994.

SHANMUGAM, M.; MODY, K. H.; SIDDHANTA, A. K. Blood anticoagulant sulphated polysaccharides of the marine green algae *Codium dwarkense* (Boergs.) and *C. tomentosum* (Huds.) Stackh. **Indian J Exp Biol.** v. 39, n. 4, p. 365-370, 2001.

SHIBATA, H.; KIMURA-TAKAGI, I.; NAGAOKA, M.; HASHIMOTO, S.; AIYAMA, R.; IHA, M.; UEYAMA, S.; YOKOKURA, T. Properties of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus tokida* in gastric mucosal protection. **Biofactors.** v. 11, n. 4, p. 235-245, 2000.

SHIBATA, H.; NAGAOKA, M.; TAKAGI, I. K.; HASHIMOTO, S.; AIYAMA, R.; YOKOKURA, T. Effect of oligofucose derivatives on acetic acid-induced gastric ulcer in rats. **Biomed Mater Eng.** v. 11, n. 1, p. 55-61, 2001.

SHIMAOKA, M.; IKEDA, M.; IIDA, T.; TAENAKA, N.; YOSHIYA, I.; HONDA, T. Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs. **Am J Respir Crit Care Med.** v. 153, n. 1, p. 307-311, 1996.

SIDDHANTA, A. K.; SHANMUGAM, M.; MODY, K. H.; GOSWAMI, A. M.; RAMAVAT, B. K. Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. from the west coast of India: chemical composition and blood anticoagulant activity. **Int J Biol Macromol.** v. 26, n. 2-3, p. 151-154, 1999.

SILVA, T. M.; ALVES, L. G.; QUEIROZ, K. C. S.; SANTOS, M. G.; MARQUES, C. T.; CHAVANTE, S. F.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Braz J Med Biol Res.** v. 38, n. 4, p. 523-533, 2005.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry.** v. 28, n., p. 4, 1989.

SOEDA, S.; KOZAKO, T.; IWATA, K.; SHIMENO, H. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. **Biochem Biophys Acta.** v. 1497, n. 1, p. 127-134, 2000.

- SPECTOR, T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. **Anal Biochem.** v. 86, n. 1, p. 142-146, 1978.
- STEVAN, F. R.; OLIVEIRA, M. B.; BUCCHI, D. F.; NOSEDA; IACOMINI, M.; DUARTE, M. E. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharides from seaweeds. **J Submicrosc Cytol Pathol.** v. 33, n. 4, p. 477-484, 2001.
- SUAREZ, S. S.; REVAH, I.; LO, M.; KÖLLE, S. Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a  $Ca^{2+}$ -dependent lectin on sperm that recognizes lewis-a trisaccharide. **Biol. Reprod.** v. 59, n., p. 6, 1998.
- SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J Agric Food Chem.** v. 50, n. 25, p. 7449-7454, 2002.
- TAGA, M. S.; MILLER, E. E.; PRATT, D. E. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society.** v. 61, n., p. 4, 1984.
- TEIXEIRA, M. M.; ROSSI, A. G.; HELLEWELL, P. G. Adhesion mechanisms involved in C5a-induced eosinophil homotypic aggregation. **J Leukoc Biol.** v. 59, n. 3, p. 389-396, 1996.
- TERUYA, T.; KONISHI, T.; UECHI, S.; TAMAKI, H.; TAKO, M. Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells. **Int J Biol Macromol.** v. 41, n. 3, p. 221-226, 2007.
- TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature.** v. 166, n. 4219, p. 444-445, 1950.
- TRIOUS, A.; SEBRANEK, J. G. Carrageenans and their use in meat products. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v. 36, n. 1-2, p. 69-85, 1996.
- USUI, T.; ASARI, K.; MIZUNO, T. Isolation of highly purified fucoidan from *eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities. **Agric.. Biol. Chem.** v. 44, n., p. 2, 1980.
- VISCHER, P.; BUDDECKE, E. Different action of heparin and fucoidan on arterial smooth muscle cell proliferation and thrombospondin and fibronectin metabolism. **Eur J Cell Biol.** v. 56, n. 2, p. 407-414, 1991.
- WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; LI, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **Int J Biol Macromol.** v. 42, n. 2, p. 127-132, 2008.
- WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **Gen Pharmacol.** v. 29, n. 4, p. 497-511, 1997.
- YE, H.; WANG, K.; ZHOU, C.; LIU, J.; ZENG, X., Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. In 2008.

YUAN, Y. V.; WALSH, N. A. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. **Food Chem Toxicol.** v. 44, n. 7, p. 1144-1150, 2006.

ZHANG, Q.; LI, N.; ZHOU, G.; LU, X.; XU, Z.; LI, Z. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) in aging mice. **Pharmacol Res.** v. 48, n. 2, p. 151-155, 2003a.

ZHANG, Q.; YU, P.; LI, Z.; ZHANG, H.; XU, Z.; LI, P. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanesis*. **Journal of Applied Phycology** v. 15, n., p. 6, 2003b.

ZHOU, G. F.; SHENG, W. X.; YAO, W. H.; WANG, C. H. Effect of low molecular lambda-carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. **Pharmacological Research.** v. 53, n. 2, p. 129-134, 2006.

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

ZHUANG, C.; ITOH, H.; MIZUNO, T.; H, I. Antitumor active fucoidan from brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum thumbergii*). **Biotech. Biochem.** v. 4, n., p. 5, 1995.

ZVYAGINTSEVA, T. N.; SHEVCHENKO, N. M.; NAZAROVA, I. V.; SCOBUN, A. S.; LUK'YANOV, P. A.; ELYAKOVA, L. A. Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** v. 126, n. 3, p. 209-215, 2000.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)