



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

MARIANA SANTANA SANTOS PEREIRA DA COSTA

**EFEITO DA SALINIDADE DA ÁGUA DO MAR NO RENDIMENTO,
COMPOSIÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FRAÇÕES
POLISSACARÍDICAS DA CHLOROPHYTA *Caulerpa*
*cupressoides var. flabellata***

**NATAL/RN
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MARIANA SANTANA SANTOS PEREIRA DA COSTA

**EFEITO DA SALINIDADE DA ÁGUA DO MAR NO RENDIMENTO,
COMPOSIÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FRAÇÕES
POLISSACARÍDICAS DA CHLOROPHYTA *Caulerpa*
*cupressoides var. flabellata***

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/RN
2010**

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de
Biociências

Costa, Mariana Santana Santos Pereira da.

Efeito da salinidade da água do mar no rendimento, composição e atividades biológicas de frações polissacarídicas da Chlorophyta *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata* / Mariana Santana Santos Pereira da Costa. – Natal, RN, 2010.

89 f.

Orientador: Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

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

1. Alga verde – Dissertação. 2. Salinidade – Dissertação. 3. Polissacarídeos sulfatados – Dissertação. I. Rocha, Hugo Alexandre de Oliveira. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 582.263

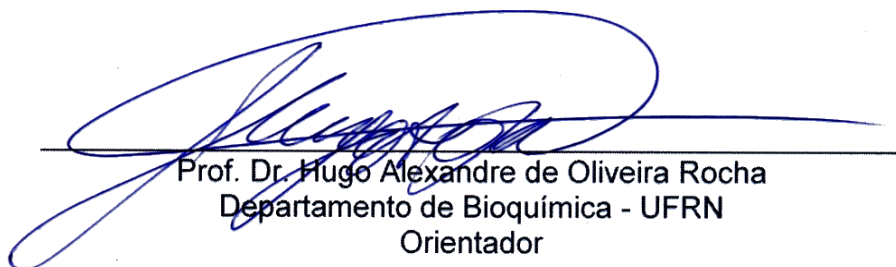
MARIANA SANTANA SANTOS PEREIRA DA COSTA

**EFEITO DA SALINIDADE DA ÁGUA DO MAR NO RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO
E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA
CHLOROPHYTA *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata***

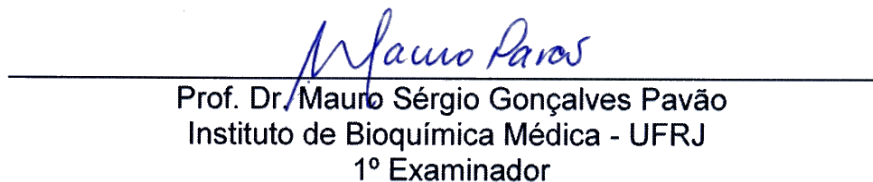
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: 19/03/2010

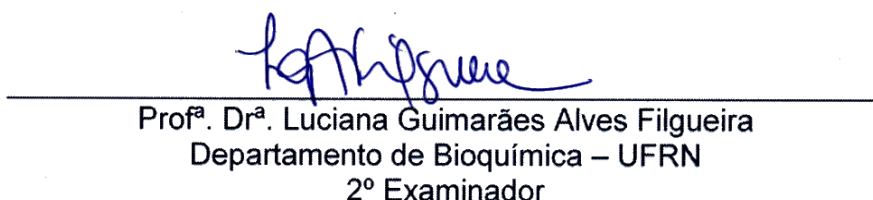
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão
Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ
1º Examinador



Prof.ª. Dr.ª. Luciana Guimarães Alves Filgueira
Departamento de Bioquímica – UFRN
2º Examinador

Dedico esta obra:

Ao meu pai, Tadeu (homenagem póstuma), por seu apoio, proteção, cuidado e amor. Por todas as noites, durante a minha graduação e metade do meu mestrado, percorrer de 13 a 20 Km só para me pegar ao sair da UFRN, com cuidado para que nada pudesse me acontecer. Espero um dia ser para os meus filhos, o exemplo de pai que você foi e sempre será para mim.

A minha mãe, Fátima, por sua dedicação, incentivo, apoio e amor, por estar ao meu lado em todos os momentos e por todos os sacrifícios que enfrentou para que eu pudesse chegar até aqui.

Essa conquista é para vocês!!!

Dedico esta obra:

Ao meu orientador Prof. Dr. Hugo Rocha, que é para mim um exemplo de professor e orientador e que com seus ensinamentos fez com que eu pudesse despertar o interesse e a paixão pela Bioquímica. E ao meu amigo Hugo pelo apoio, incentivo, preocupação, amizade e confiança em todos os momentos de minha vida acadêmica e pessoal. A você, a minha eterna gratidão!!!

Hugo, você é para mim, e creio que para todos do BIOPOL, um professor, orientador e amigo estrela, pois:

"Neste mundo existem pessoas Estrelas e pessoas Cometas. Os Cometas passam, apenas são lembrados pelas datas que passam e retornam. As Estrelas permanecem, assim como o sol, passam anos, milhões de anos, e as Estrelas permanecem. Há muita gente Cometa. Gente que passa pela nossa vida apenas por instantes. Importante é ser Estrela. Estar junto. Ser luz, calor, ser vida. Podem passar anos, podem surgir distâncias, mas a marca fica no coração. Há necessidade de se criar um mundo de Estrelas. Para podermos contar com elas, senti-las como luz e calor. Assim são os amigos, Estrelas na vida da gente. São aragem nos momentos de tensão e luz nos momentos de desânimo. Ser Estrela nesse mundo passageiro, nesse mundo cheio de pessoas Cometas, é um desafio. Mas acima de tudo, uma recompensa. Recompensa de ter sido luz para muitos amigos, calor para muitos corações e acima de tudo, saber que nascemos e vivemos, e não somente existimos. É nascer e ter vivido e não apenas existido."

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado, me guiando e ajudando a vencer todos os obstáculos que aparecem em meu caminho. “Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal nenhum, porque tu estás comigo” (Salmo 23.4).

Aos meus pais, Tadeu (homenagem póstuma) e Fátima, por ficarem felizes com minhas vitórias, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e incentivando. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Thiago e João Neto e as minhas avós Conceição e Mãezinha (homenagem póstuma) pela confiança e amor. E a todos os meus demais familiares, em especial ao meu Tio Eider, pelo carinho, cuidado e apoio; e a Rosa, Yasmim e Edinho pelo carinho e admiração.

Ao meu noivo, Adaires pela força, apoio, incentivo, amor e, em especial, pelos sete anos de paciência comigo. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos e por, geralmente, não ficar chateado sempre que me atrasava por causa dos meus eternos experimentos. Muito obrigada, meu amor!

Ao meu orientador Prof. Hugo Rocha pelos seus ensinamentos, confiança, convívio e amizade. Obrigada por me ajudar a crescer como pessoa e profissional!

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte por fornecer as condições necessárias para realização deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq por financiarem este trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial, as Professoras Edda Lisboa e Luciana da Matta e aos professores Maurício Sales e Elizeu Antunes pelo convívio e ensinamentos desde a minha graduação.

À Prof^{ta} Dr^a Jacira Sousa e a Aurila Bay pela ajuda na realização da composição centesimal.

À Prof^{ta} Dr^a Márcia Rodrigues e a Cypriano Galvão do Departamento de Química da UFRN pela realização da espectroscopia de infravermelho.

À Prof^a Dr^a Eliane Marinho Soriano, do Departamento de Oceanografia e Limnologia da UFRN pelo auxílio na identificação da espécie da alga, objeto deste estudo.

Aos professores da banca de pré-qualificação, Kátia Scortecci e Luis Abreu, e as professoras da banca de qualificação Aurigena Ferreira, Julianna Souza e Kátia Scortecci por terem aceito fazer parte das bancas e por todas as sugestões. Obrigada!

À Ana Karinne e Patrícia do Departamento de Fisiologia da UFRN pelos empréstimos do refratômetro. Obrigada!

Ao BIOPOL, minha segunda casa, e a todos que fazem parte desta família: Prof. Hugo (por ter me dado a oportunidade de fazer parte desta família), Duda e Ivan (por terem me acolhido quando cheguei ao BIOPOL), Leandro (por ter sido o primeiro a me receber no BIOPOL, por ter me ensinado muito do que hoje eu sei e por, até hoje, me aguentar o aperreando), Sara (minha primeira companheira de bancada, pela amizade e ajuda), Jailma (pela amizade e por sempre me tirar do sufoco com as formatações de textos e figuras), Nednaldo (pela amizade, carinho e por estar sempre disposto a me ajudar), Popó (pela descontração, brincadeiras e ajuda com as colunas de cromatografia), Ruth (minha M.A., pela alegria, pelas conversas, pelas coletas), Cinthia e Raniera (por todos os dias que passamos estudando para as disciplinas do mestrado, conseguimos... Não tiramos C), Ana (pelas conversas), Edjane (por ter me dado a chance de trabalhar no biotério, era cansativo... mas eu gostava), Rafael (pelos sorrisos, alegria e, é claro, pelos cupuaçus), Leonardo (pelas palhaçadas e descontração), Kaline (Malu), Dayanne (Helena) e Naissandra (pelas suas alegrias contagiantes e descontração), Railson (pelo apoio e amizade desde a graduação), Gabriel e Arthur (por estarem sempre dispostos a ajudar), Sayonara e Juliana (por terem passado por aqui e deixado suas marcas), aos recém chegados Leticia, Joana, Moacir, Vinicius e Fernando e para a sempre agregada e inesquecível Cybelle. Enfim, obrigada a todos pelo auxílio na bancada, por sorrirem comigo nos momentos de alegria e terem chorado comigo no momento de tristeza. Obrigada! Nunca vou esquecer-me de vocês!!!

À Jailma, Ruth, Arthur e Nednaldo por me ajudarem na finalização desta dissertação.

Ao meu amigo Nednaldo pela ajuda nos experimentos e, além disso, pela sua amizade, carinho e apoio. Obrigada! Brigo muito com você, mas mesmo assim, você é especial!!!

À Sara, minha amiga da graduação, do BIOPOL, do Vida é Alegria e principalmente minha amiga pessoal. Obrigada por sua amizade, por sempre me apoiar, pelo incentivo durante os obstáculos, pelas palavras de força nos momentos de tristezas, por se alegrar com minhas vitórias.... Adoro você minha amiga e irmã de coração!!!

À Jailma (Ja) por ser a pessoa mais bondosa que conheço, pela amizade, pelo carinho, pelo apoio, por estar sempre disposta a me ajudar, por aturar pacientemente minhas reclamações, e, especialmente, por ser minha design gráfica particular. Adoro você!!!

Aos meus inesquecíveis amigos da graduação: Railson, Joana (Joyce) e Christier. Obrigada pela amizade de vocês, pelos momentos de descontração e pela força! Nunca vou esquecer essa turminha!

Aos vários colegas de Departamento de Bioquímica pela convivência, pelos sorrisos e conversas nos corredores do DBQ, Norberto, Cleysyvan, Mila, Marília, Adeliana, Philipe (13 anos), Ticiane, Virgínia, Núbia, Dayse Santos, Dayse Caroline, Leonardo Capistrano, Luciana, Jannison, João Neto e aos antigos amigos Adriana Brito, Robério, Cybelle... em especial a minha amiga Roberta.

Aos meus colegas da turma de Mestrado em Bioquímica, em especial aos meus amigos Norberto (obrigada pelas liofilizações!), Cinthia, Lahyana, Nilmara, Cris e Raniera pelos incansáveis momentos de estudos durante as disciplinas, bem como, pelas brincadeiras, sorrisos, conversas... Apesar da pressão, sinto saudades daquela época!!! Vocês sempre serão guardados no meu coração!!!

Ao professor Luis Abreu, que em um dos momentos mais estressantes do mestrado, período de disciplinas, gentilmente, cedeu sua sala para que a minha turma de mestrado pudesse estudar.

Aos meus amigos da Crisma do IFRN, Adaires, Rochele, Ricardo, Jobson, Josi, Fernando, Deimison, Luciana e Andreza, obrigada pela amizade de vocês, por sempre estarem presentes em todos os momentos tristes e alegres de minha vida e por me ajudarem a conhecer o nosso Deus cada vez mais. (Amigos, pra sempre, dois amigos que nasceram pela fé. Amigos, pra sempre, para sempre amigos sim, se Deus quiser... (Anjos de Resgate). Amo vocês!

Aos amigos do grupo Vida é Alegria, em especial, a Mileide e Dona Neide, por terem me dado a oportunidade de saber como é gratificante ajudar aos outros. Vocês são muito importantes para mim!

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“A vida é realmente escuridão, exceto quando há impulso.
E todo impulso é cego quando não há saber,
e todo saber é vazio, exceto quando não há trabalho.
E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor.
E quando trabalhais com amor, vós vos unis a vós próprios,
e uns aos outros e a Deus.”*

(Khalil Gibran)

RESUMO

Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas têm sido descritos por apresentarem diversas atividades farmacológicas. No entanto, nada se sabe a respeito da influência da salinidade da água do mar na estrutura de polissacarídeos sulfatados de algas verdes e nas atividades farmacológicas por eles desempenhadas. Por isso, objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito da salinidade da água do mar no rendimento e na composição de frações polissacarídicas da alga verde *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*, coletada em duas praias de diferentes salinidades do litoral do Rio Grande do Norte, bem como verificar se as alterações provocadas pela salinidade se refletiriam em atividades biológicas das frações. Extraiu-se quatro frações ricas em polissacarídeos sulfatados da *C. cupressoides* coletada na praia de Camapum (denominado CCM F0.3, F0.5, F1.0, F2.0), a qual a água tem maior salinidade, e na praia de Búzios (denominados CCB F0.3; F0.5, F1.0, F2.0). Diferente do observado para outras algas, a composição centesimal da *C. cupressoides* não se alterou em função desta crescer em ambiente de maior da salinidade. Além disso, interessante, a *C. cupressoides* têm altas quantidades de proteínas, maior até do espécies de algas comestíveis. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o rendimento das frações polissacarídicas da CCM e das suas correlatas na CCB, o que indica que a salinidade não interfere no rendimento das frações polissacarídicas. No entanto, houve uma diferença significativa na razão sulfato/açúcar da F0.3 ($p < 0,05$) e F0.5 ($p < 0,01$) (a razão sulfato/açúcar da CCM F0.3 e da CCB F0.5 foram maiores do que suas correlatas), enquanto a razão sulfato/açúcar da F1.0 e F2.0 não se alterou significativamente ($p > 0,05$) com a salinidade. Este resultado sugere que a diferença observada na razão sulfato/açúcar entre as frações da CCM e CCB, não é, meramente, função da salinidade, mas provavelmente está relacionada com a função biológica destes biopolímeros nas algas marinhas. Além disso, a variação de salinidade entre os locais de coleta não influenciou a composição monossacarídica, a mobilidade eletroforética ou os espectros de infravermelho das frações polissacarídicas, demonstrando que a salinidade não altera a composição de polissacarídeos sulfatados de *C. cupressoides*. Houve diferenças nas atividades antioxidantes e anticoagulantes entre a CCM e CCB. CCB F0.3 (mais sulfatada) apresentou maior capacidade antioxidante total que CCM F0.3, já a habilidade

quelante da CCM F0.5 foi mais potente que a CCB F0.5 (mais sulfatada). Estes dados indicam que, provavelmente, as atividades biológicas das frações polissacarídicas da CCM e CCB dependem do padrão de distribuição espacial dos grupos sulfatos no polímero e que não é, meramente, um efeito da densidade de carga. Polissacarídeos de *C. cupressoides* também exibiram atividade anticoagulante na via intrínseca (aPTT) e via extrínseca (teste PT). CCB F1.0 e CCM F1.0 mostraram diferenças significantes ($p < 0,001$) no aPTT, já F0.3 e F0.5 não mostraram diferença ($p > 0,05$) entre a CCM e CCB, corroborando o fato de que a razão sulfato/açúcar não é um fator determinante para a atividade biológica, mas sim, a distribuição do sulfato ao longo da cadeia do polissacarídeo. Além disso, F0.3 e F0.5 apresentaram atividade no teste de aPTT semelhante a clexane®, medicamento anticoagulante. Adicionalmente, as F0.5 mostraram atividade no PT. Estes resultados sugerem que a salinidade pode ter criado sutis diferenças na estrutura dos polissacarídeos sulfatados, como por exemplo, na distribuição dos grupos sulfatos, o que ocasionaria as diferenças nas atividades biológicas entre as frações da CCM e da CCB.

Palavras-chave: alga verde. salinidade. polissacarídeos sulfatados. atividade antioxidante. atividade anticoagulante.

ABSTRACT

Seaweeds sulfated polysaccharides have been described as having various pharmacological activities. However, nothing is known about the influence of salinity on the structure of sulfated polysaccharides from green seaweed and pharmacological activities they perform. Therefore, the main aim of this study was to evaluate the effect of salinity of seawater on yield and composition of polysaccharides-rich fractions from green seaweed *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*, collected in two different salinities beaches of the coast of Rio Grande do Norte, and to verify the influence of salinity on their biological activities. We extracted four sulfated polysaccharides-rich fractions from *C. cupressoides* collected in Camapum beach (denominated CCM F0.3; F0.5; F1.0; F2.0), which the seawater has higher salinity, and Buzios beach (denominated CCB F0.3; F0.5; F1.0; F2.0). Different from that observed for other seaweeds, the proximate composition of *C. cupressoides* did not change with increased salinity. Moreover, interestingly, the *C. cupressoides* have high amounts of protein, greater even than other edible seaweeds. There was no significant difference ($p > 0.05$) between the yield of polysaccharide fractions of CCM and its CCB counterparts, which indicates that salinity does not interfere with the yield of polysaccharide fractions. However, there was a significant difference in the sulfate/sugar ratio of F0.3 ($p < 0.05$) and F0.5 ($p < 0.01$) (CCM F0.3 and CCB F0.5 was higher than those determined for their counterparts), while the sulfate/sugar ratio the F1.0 and F2.0 did not change significantly ($p > 0.05$) with salinity. This result suggested that the observed difference in the sulfate/sugar ratio between the fractions from CCM and CCB, is not merely a function of salinity, but probably also is related to the biological function of these biopolymers in seaweed. In addition, the salinity variation between collection sites did not influence algal monosaccharide composition, eletrophoretic mobility or the infrared spectrum of polysaccharides, demonstrating that the salinity does not change the composition of sulfated polysaccharides of *C. cupressoides*. There were differences in antioxidant and anticoagulant fractions between CCM and CCB. CCB F0.3 (more sulfated) had higher total antioxidant capacity that CCM F0.3, since the chelating ability the CCM F0.5 was more potent than CCB F0.5 (more sulfated). These data indicate that the activities of sulfated polysaccharides from CCM and CCB depend on the spatial patterns of sulfate groups and that it is unlikely to be merely a charge density effect.

C. cupressoides polysaccharides also exhibited anticoagulant activity in the intrinsic (aPTT test) and extrinsic pathway (PT test). CCB F1.0 and CCM F1.0 showed different ($p < 0,001$) aPTT activity, although F0.3 and F0.5 showed no difference ($p > 0,05$) between CCM and CCB, corroborating the fact that the sulfate/sugar ratio is not a determining factor for biological activity, but rather for sulfate distribution along the sugar chain. Moreover, F0.3 and F0.5 activity in aPTT test was similar to that of clexane®, anticoagulant drug. In addition, F0.5 showed PT activity. These results suggest that salinity may have created subtle differences in the structure of sulfated polysaccharides, such as the distribution of sulfate groups, which would cause differences in biological activities between the fractions of the CCM and the CCB.

Keywords: green seaweed. seawater salinity. sulfated polysaccharide. antioxidant activity. anticoagulant activity.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 01 | Redução tetravalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O), com a formação de espécies reativas do oxigênio (ERO) | 22 |
| Figura 02 | Reações de formação do radical hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio | 23 |
| Figura 03 | Modelo clássico da cascata de coagulação | 30 |
| Figura 04 | Novo modelo da cascata de coagulação | 31 |
| Figura 05 | Localização dos pontos de coleta da <i>C. cupressoides</i> no litoral do Rio Grande do Norte | 40 |
| Figura 06 | Alga verde <i>Caulerpa cupressoides</i> var. <i>flabellata</i> utilizada neste trabalho | 41 |
| Figura 07 | Rendimento percentual das frações polissacarídicas da alga <i>C. cupressoides</i> coletada na praia de Camapum (CCM) e na praia de Búzios (CCB) obtidas com o fracionamento com acetona | 55 |
| Figura 08 | Comportamento eletroforético das frações polissacarídicas da <i>C. cupressoides</i> resultantes do fracionamento com acetona | 59 |
| Figura 09 | Espectroscopia de infravermelho das frações polissacarídicas da alga <i>C. cupressoides</i> | 60 |
| Figura 10 | Capacidade antioxidante total das frações polissacarídicas da alga <i>C. cupressoides</i> coletada na praia de Camapum (CCM) e na praia de Búzios (CCB) | 61 |
| Figura 11 | Quelação férrica das frações polissacarídicas da alga <i>C. cupressoides</i> coletada na praia de Camapum (CCM) e na praia de Búzios (CCB) | 62 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 01 | Principais espécies de algas marinhas que tiveram seus polissacarídeos sulfatados naturais analisados em diferentes testes antioxidantes | 28 |
| Tabela 02 | Polissacarídeos sulfatados de algas verdes com atividade anticoagulante | 35 |
| Tabela 03 | Temperatura e salinidade da água do mar das praias de Camapum e Búzios | 54 |
| Tabela 04 | Composição centesimal da alga <i>C. cupressoides</i> | 54 |
| Tabela 05 | Composição química e massa molecular das frações de polissacarídeos sulfatados da alga <i>C. cupressoides</i> | 57 |
| Tabela 06 | Relação molar dos monossacarídeos das frações de polissacarídeos sulfatados da CCM e CCB | 58 |
| Tabela 07 | Atividade anticoagulante no teste de aPPT das frações polissacarídicas isoladas da <i>C. cupressoides</i> | 64 |
| Tabela 08 | Atividade anticoagulante no teste de PT das frações polissacarídicas isoladas da <i>C. cupressoides</i> | 64 |
| Tabela 09 | Composição centesimal da alga <i>C. cupressoides</i> e de algumas algas marinhas comestíveis | 67 |

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

| | |
|-----------------|--|
| AAPH | dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) |
| aPTT | Tempo de tromboplastina parcial ativada |
| ARA | Arabinose |
| AT | Antitrombina |
| BHA | Hidroxianilose butilado |
| BHT | Hidroxitolueno butilado |
| BIOPOL | Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais da UFRN |
| CAPM | Cininogênio de alto peso molecular |
| CAT | Capacidade antioxidante total |
| CCB | <i>Caulerpa cupressoides</i> coletada na praia de Búzios (Nísia Floresta/RN) |
| CCM | <i>Caulerpa cupressoides</i> coletada na praia de Camapum (Macau/RN) |
| CETAVLON | Brometo de cetiltrimetilamônio |
| DPPH | 1,1- difenil-2-picrilhidrazila |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| ERO | Espécies reativas do oxigênio molecular |
| F0.3 | Fração precipitada com 0,3 volumes de acetona |
| F0.5 | Fração precipitada com 0,5 volumes de acetona |
| F1.0 | Fração precipitada com 1,0 volume de acetona |
| F2.0 | Fração precipitada com 2,0 volumes de acetona |
| FII | Protrombina |
| FIIa | Trombina |
| FIX | Fator de Christmas |
| FT | Fator Tecidual |
| FUC | Fucose |

| | |
|--------------|----------------------------------|
| FV | Pró-acelerina |
| FVII | Pró-convertina |
| FVIII | Anti-hemofílico |
| FX | Fator de Stuart-Power |
| FXI | Antecedente de tromboplastina |
| FXII | Fator de Hageman |
| FXIII | Fator estabilizante de Fibrina |
| GAG's | Glicosaminoglicanos |
| GAL | Galactose |
| GLI | Glicose |
| GPx | Glutathione peroxidase |
| HCII | Cofator II da heparina |
| LDL | Lipoproteínas de baixa densidade |
| MAN | Manose |
| NBT | Nitroblue tetrazolium |
| NO | Óxido nítrico |
| PDA | 1,3 diamino propano acetato |
| PG | Galato propil |
| PK | Pré-caliceína |
| PT | Tempo de protrombina |
| RAM | Ramnose |
| SOD | Superóxido dismutase |
| TBHQ | <i>tert</i> -butilhidroquinona |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TT | Tempo de trombina |
| XIL | Xilose |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 1.1 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS | 20 |
| 1.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS | 21 |
| 1.2.1 Espécies reativas do oxigênio (ERO) x antioxidantes | 21 |
| 1.2.2 Polissacarídeos sulfatados antioxidantes de algas marinhas | 24 |
| 1.3 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS | 29 |
| 1.3.1 Coagulação sanguínea x anticoagulantes | 29 |
| 1.3.2 Polissacarídeos sulfatados anticoagulantes de algas marinhas | 32 |
| 1.4 CARBOIDRATOS X SAZONALIDADE E PARÂMETROS AMBIENTAIS | 36 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS | 40 |
| 2.1 LOCAIS DE COLETA | 40 |
| 2.2 MATERIAIS | 41 |
| 2.2.1 Material Biológico | 41 |
| 2.2.2 Outros materiais | 42 |
| 2.2.3 Aparelhos | 43 |
| 2.3 MÉTODOS | 44 |
| 2.3.1 Determinação da salinidade e da temperatura da água do mar | 44 |
| 2.3.2 Determinação da composição centesimal da <i>C. cupressoides</i> | 44 |
| 2.3.2.1 Proteína Bruta | 44 |
| 2.3.2.2 Lipídios | 45 |
| 2.3.2.3 Cinzas | 46 |
| 2.3.2.4 Fibras | 46 |

| | |
|---|----|
| 2.3.2.5 Estimativa de Carboidratos | 47 |
| 2.3.3 Extração dos polissacarídeos da alga verde <i>C. cupressoides</i> | 47 |
| 2.3.3.1 Obtenção do pó cetônico | 47 |
| 2.3.3.2 Proteólise | 47 |
| 2.3.3.3 Fracionamento com volumes crescentes de acetona PA | 48 |
| 2.3.4 Caracterização das frações de polissacarídeos sulfatados da alga <i>C. cupressoides</i> | 48 |
| 2.3.4.1 Eletroforese em gel de agarose | 48 |
| 2.3.4.2 Análises químicas | 49 |
| 2.3.4.3 Composição monossacarídica | 50 |
| 2.3.4.4 Massa molecular | 50 |
| 2.3.4.5 Espectroscopia de infravermelho | 50 |
| 2.3.5 Atividades biológicas das frações de polissacarídeos sulfatados da <i>C. cupressoides</i> | 50 |
| 2.3.5.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> | 50 |
| 2.3.5.2 Atividade anticoagulante | 52 |
| 2.3.6 Análise estatística | 53 |
| 3 RESULTADOS | 54 |
| 3.1 TEMPERATURA E SALINIDADE DA ÁGUA DO MAR | 54 |
| 3.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA ALGA <i>C. cupressoides</i> | 54 |
| 3.3 RENDIMENTO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA <i>C. cupressoides</i> | 55 |
| 3.4 ANÁLISES QUÍMICAS, COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E MASSA MOLECULAR DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA <i>C. cupressoides</i> | 56 |
| 3.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA <i>C. cupressoides</i> | 58 |

| | |
|---|----|
| 3.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA <i>C. cupressoides</i> | 59 |
| 3.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA ALGA <i>C. cupressoides</i> | 60 |
| 3.7.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> das frações de polissacarídeos sulfatados da alga <i>C. cupressoides</i>. | 61 |
| 3.7.2 Atividade anticoagulante das frações polissacaródocas da alga <i>C. cupressoides</i> | 63 |
| 4 DISCUSSÃO | 65 |
| 5 CONCLUSÕES | 75 |
| REFERÊNCIAS | 76 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS

As macroalgas marinhas são fontes de diversos biopolímeros, alguns deles possuem grande importância para as indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Os mais utilizados atualmente são os polissacarídeos, não só por corresponderem a 80-85% do peso seco das algas (KLOAREG; QUATRANO, 1988), mas por apresentarem uma gama de aplicabilidades, como os alginatos, um tipo de mucilagem (polissacarídeo carboxilado) produzida por certas espécies de Phaeophyta, que são utilizados na fabricação de papel e como estabilizadores de cremes dentais e sorvetes (MINHAS et al., 2002); o agar (mistura de diversos polissacarídeos, principalmente, galactanas) e carragenanas (homogalactanas sulfatadas), encontradas em algumas espécies de Rhodophyta e usados para diversas finalidades na indústria farmacêutica, fabricação de cosméticos, gelatina e meios de cultura (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003; TOJO; PRADO, 2003).

Destacam-se também outros tipos de polissacarídeos, como fucanas, fucoidans e diferentes tipos de heteropolissacarídeos sulfatados, que apesar de ainda não serem utilizados comercialmente, apresentam um grande potencial econômico devido ao elevado número de atividades farmacológicas que possuem (ROCHA et al., 2005a; 2006; BARROSO et al., 2008).

Nas algas marinhas os polissacarídeos sulfatados se localizam na matriz mucilaginosa e sua função biológica, nesses seres, ainda não está bem esclarecida, porém, devido ao seu caráter altamente higroscópico, acredita-se que protejam a alga da desidratação quando essa é submetida a longos períodos de exposição ao sol durante as marés baixas. A natureza mucilaginosa destes compostos, também parece contribuir para tornar a alga flexível o bastante para crescer em ambiente líquido e rígida o suficiente para permanecer estendida, e assim, melhor captar a luz e os nutrientes existentes (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967).

Os polissacarídeos sulfatados de algas apresentam estruturas bastante diversas, variando de espécie para espécie e, às vezes, em diferentes partes da mesma alga (DIETRICH et al., 1995; ALVES, 2000). Os polissacarídeos sulfatados

encontrados nas Phaeophyta (algas marrons) são as fucanas (QUILET, 1961), as quais têm como principal característica a presença da L-fucose sulfatada na sua estrutura (ROCHA et al., 2006). Nas algas, as fucanas são encontradas tanto na forma de homo como na forma de heteropolissacarídeos (KLOAREG; QUATRANO, 1988). As Rhodophyta (algas vermelhas) apresentam as galactanas sulfatadas como grupo polissacarídico característico (SOUZA et al., 2007). Contudo, recentemente, dois trabalhos descreveram a presença de outros tipos de polissacarídeos sulfatados em algas vermelhas, como uma xilomanana contendo várias unidades de manose sulfatada na posição 2 purificada da alga *Scinaia hatei* (MANDAL et al., 2008) e um heteropolissacarídeo, constituído, principalmente, de D-fucose, D-glicose, D-manose e D-galactose, alguns resíduos de fucose se mostraram sulfatados em C2 ou C4, extraída da alga *Gloiopeltis tenax* (LIM; RYU, 2009). As Chlorophyta (algas verdes) apresentam polissacarídeos sulfatados mais heterogêneos, sendo ricos em galactose, manose, xilose, arabinose e/ou ácidos urônicos, dentre outros (HAYAKAWA et al., 2000, MAO et al., 2006; MAO et al., 2008). Porém, já foram descritos homopolissacarídeos, como arabinanas (HAYAKAWA et al., 2000; SIDDHANTA et al., 1999) e galactanas (MATSUBARA et al., 2001; FARIAS et al., 2008).

Os polissacarídeos sulfatados de algas vêm sendo descritos como possuidores de diversas atividades farmacológicas, tais como: angiogênica (SOEDA et al., 2000), antitrombótica (NADER et al., 2004; ROCHA et al., 2005a; 2005b, BARROSO et al., 2008), antiinflamatória e antinociceptiva (ALBUQUERQUE, 2005), anti-metastática e anti-tumoral (SOEDA et al., 2000), anti-úlceras (SHIBATA et al., 1998), anticoagulante (FARIAS, 2006; AZEVEDO et al., 2009, SILVA et al., 2010) e antioxidante (SOUZA et al., 2007; WANG et al., 2008, COSTA et al., 2010).

1.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS

1.2.1 Espécies reativas do oxigênio (ERO) x antioxidantes

Radical livre é qualquer espécie química (átomo, íon ou molécula) que contém um elétron não pareado em sua camada de valência (última camada). No caso dos sistemas biológicos a fonte mais comum de radicais livres é o oxigênio (WICKENS, 2001).

O oxigênio molecular (O_2) é fundamental para o metabolismo celular e produção de energia. Porém, a degradação do oxigênio também produz agentes altamente reativos que podem causar danos aos tecidos biológicos, esses radicais livres são chamados de espécies reativas do oxigênio (ERO) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Há vários modos pelos quais os radicais livres podem ser formados, o principal local no meio intracelular é na mitocôndria, onde o oxigênio sofre uma redução tetraivalente em passos sequentes resultando na formação de água, como ilustrado na figura 01. Durante esse processo são formados vários intermediários de vida-curta, como radical hidroxila (OH^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005).

Além de serem produtos do processo metabólico, as ERO também podem ser produzidas por outros fatores, como mediadores de carcinogênese, injúria inflamatória (BANERJEE; DASGUPTAN; DE; 2005) e fontes ambientais (luz ultravioleta, radiação ionizante e poluentes como paraquato, substância tóxica usada como herbicida) (WICKENS, 2001).

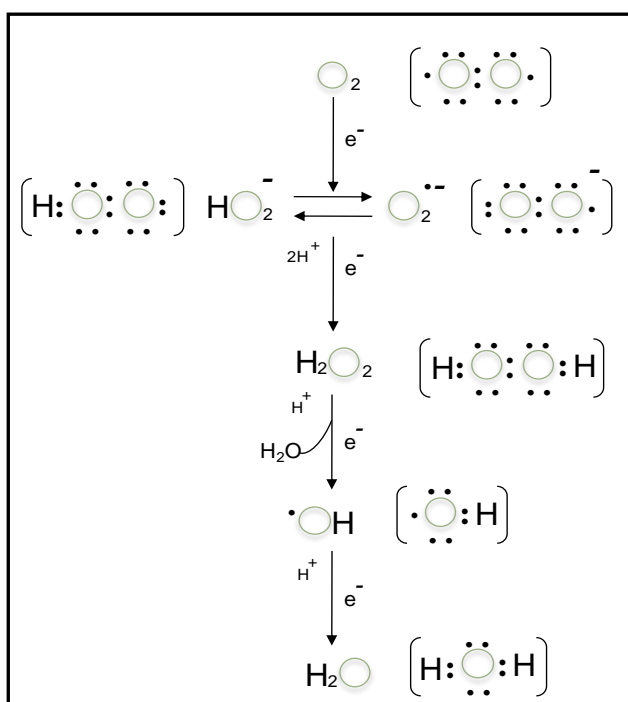


Figura 01: Redução tetraivalente do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O), com a formação de espécies reativas do oxigênio (ERO).

Fonte: Adaptado de FERREIRA; MATSUBARA, 1997.

Os radicais superóxido e hidroxila têm um elétron não pareado na sua camada externa e são altamente reativos. O peróxido de hidrogênio é também tóxico para as células, mas não possui elétrons desemparelhados, no entanto, pode reagir com metais de transição reduzidos (reação de Fenton) formando o radical hidroxila (WICKENS, 2001). Além disso, o radical hidroxila pode ser formado pela reação de Haber-Weiss, na qual o peróxido de hidrogênio reage com o radical superóxido, e também pode ser formado quando uma forma reduzida do cobre entra em contato com o peróxido de hidrogênio (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005), como observado na figura 02.

Esses radicais livres podem acarretar danos a uma grande variedade de biomoléculas, ocasionando, por exemplo, a peroxidação lipídica das membranas celulares (MELLO FILHO; HOFFMAM; MENEGHINI, 1984).

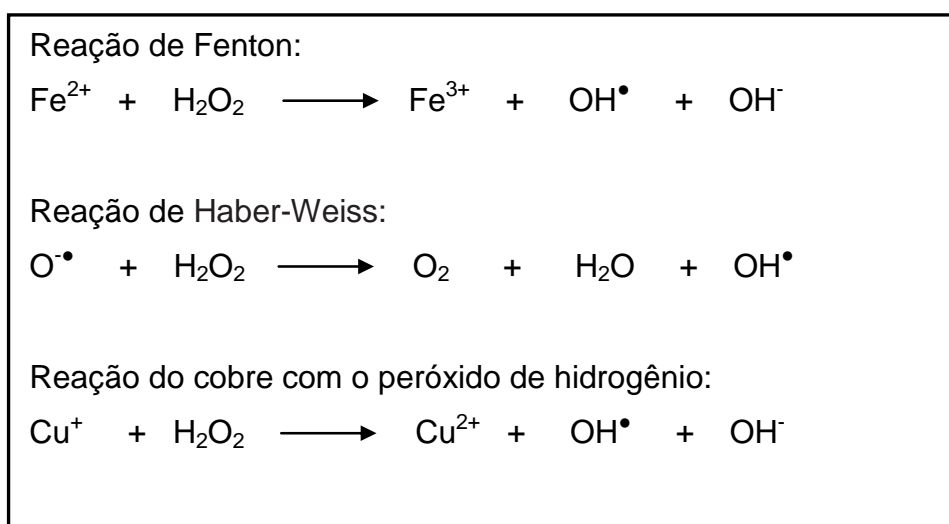


Figura 02: Reações de formação do radical hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio.

Fonte: Adaptado de ANDRADE JÚNIOR et al., 2005.

Elevados níveis de ERO podem produzir estresse oxidativo e defeitos no metabolismo que podem levar a muitas doenças, incluindo desordens degenerativas, doenças cardiovasculares, doença de Parkinson, além de estarem associados ao desenvolvimento de câncer e ao envelhecimento (SHASHOUA et al., 2004; LI et al., 2007).

O conjunto das substâncias que neutralizam os efeitos danosos das ERO constitui o sistema de defesa antioxidante, ou seja, os antioxidantes são substâncias

que neutralizam ou previnem a oxidação de substratos oxidáveis (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005.).

A primeira linha de defesa às ERO inclui complexos antioxidantes, como vitamina E, A e C, glutatona e ácido úrico, e enzimas antioxidantes varredoras das ERO, como a glutatona peroxidase (GPx), a catalase e a superóxido dismutase (SOD). A GPx é uma selenoenzima que inativa o H₂O₂, bem como um grande número de hidroperóxidos lipídicos; a catalase catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e a SOD catalisa dismutação de dois ânions superóxidos para formar H₂O₂ e água (NG et al., 2005; LI et al., 2007).

Embora quase todos os organismos sejam equipados com sistemas de defesa antioxidante e de reparo envolvidos na proteção contra o dano oxidativo, estes sistemas são frequentemente inadequados para prevenir completamente o dano. Por isso, organismos fazem uso de substâncias antioxidantes exógenas, provenientes da alimentação, como ferramenta adicional para combaterem os radicais livres (SIMIC, 1988).

Os antioxidantes sintéticos mais usados atualmente são o hidroxianilose butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), *tert*-butilhidroquinona (TBHQ) e o galato propil (PG), os quais são utilizados como aditivos alimentares. Porém, o uso de antioxidantes sintéticos está sob regulação restrita devido ao perigo a saúde que os mesmos apresentam, por exemplo, BHA e BHT têm sido suspeitos de causar danos no fígado e carcinogênese (QI et al., 2005a, LI et al., 2007).

Assim, é essencial a descoberta e a utilização de antioxidantes naturais que possam proteger organismos, como o humano, dos radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas, além de antioxidantes que possam ser utilizados na indústria alimentícia.

1.2.2 Polissacarídeos sulfatados antioxidantes de algas marinhas

As algas marinhas estão expostas à luz ultravioleta (UV) e a altas concentrações de oxigênio; além disso, vivem num ambiente de constante estresse salino e hidrolítico, esses fatores levam a formação de radicais livres e outros fortes agentes oxidantes, no entanto, as algas não sustentam qualquer oxidação e

processos de danos fotodinâmicos durante o curso de suas vidas. Este fato implica que as suas células têm alguns mecanismos (como enzimas antioxidantes: SOD, GPx, catalase e ascorbato peroxidase) e compostos de proteção antioxidante (como compostos fenólicos e vitaminas) (MATSUKAWA et al., 1997; HOYER; KARSTEN; WIENCKE, 2002; ROCHA et al., 2007). Por isso, as algas marinhas são um dos potenciais recursos renováveis fornecedores de compostos que possam ser utilizados como antioxidantes por seres humanos.

Estudos da atividade antioxidante de extratos de algas marinhas vêm sendo de bastante interesse nos últimos anos. Extratos metanólicos e etanólicos são de longe os mais estudados (YUAN; WALSH, 2006; CHO et al., 2007; GANESAN; KUMAR; BHASKAR, 2008).

Yan, Nagata e Fan (1998) realizaram um estudo com extratos de 27 espécies de algas marinhas utilizando vários solventes. Quinze destas algas apresentaram uma alta atividade antioxidante pelo teste de sequestro do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), sendo as maiores atividades apresentadas pelas algas vermelhas *Gelidium amansii*, *Gloiosiphonia capillaris*, *Polysiphonia urceolata*, *Rhodomela teres* e pelas algas marrons *Sargassum kjellmanianum*, *Desmarestia viridis*. Todas as algas também apresentaram uma boa atividade sequestradora de radicais hidroxila, sendo as mais ativas a *Rhodomela teres* e *Chorda filum*. Extratos de vários solventes também de *Kappaphycus alvarezii* exibiram excelente efeito no teste de sequestro de DPPH, poder redutor e quelação férrica (KUMAR; GANESAN; RAO, 2008).

Com relação a extratos ricos em polissacarídeos sulfatados, Costa et al. (2010) avaliaram extratos de 11 espécies de algas marinhas tropicais (uma espécie comestível de Rhodophyta, seis espécies de Phaeophyta e quatro espécies de Chlorophyta) coletadas no litoral do Rio Grande do Norte. Esta varredura destacou o grande potencial antioxidante (capacidade antioxidante total, poder redutor e quelação férrica) de quatro espécies: *Caulerpa sertularioides*, *Dictyota cervicornis*, *Sargassum filipendula* e *Dictyopteris delicatula*. Outro estudo com extrato de polissacarídeos sulfatados foi realizado com a alga marrom *Turbinaria ornata*, seu extrato apresentou atividade antioxidante pelos testes de sequestro de DPPH, sequestro de óxido nítrico e inibição da peroxidação lipídica (ANANTHI et al., 2010).

Em se tratando de atividade antioxidante de polissacarídeos sulfatados, os mais estudados são os provenientes de algas marrons. Fucoidans de *Laminaria japonica* foram avaliados por Xue et al. (2001) quanto ao potencial antioxidante, usando o modelo de oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL); os polissacarídeos testados foram fortemente ativos na proteção da oxidação de LDL induzida por AAPH (dicloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)), mas não para aquela induzida por Cu^{2+} . Fucoidans, desta mesma alga, obtidos por fracionamento em cromatografia de troca iônica (0.5 M, 1.0 M e 1.5 M de NaCl) também mostraram uma alta atividade antioxidante pelo mecanismo de sequestro dos radicais superóxido e hidroxila (WANG et al., 2008) e atividade pelo teste de sequestro do DPPH e poder redutor (WANG et al., 2010). Viu-se também que fucoidans de *L. japonica* modificados pela adição de grupamentos mostraram excelente atividade antioxidante, principalmente, os benzoilados (WANG et al., 2009a) e fosforilados (WANG et al., 2009b).

Polissacarídeos da alga marrom *Fucus vesiculosus* apresentaram alto poder de redução do íon ferro (RUPÉREZ; AHRAZEM; LEAL, 2002) e atividade sequestradora dos radicais superóxido e hidroxila (SOUZA et al., 2007). Já os polissacarídeos de *Padina gymnospora* apresentaram atividade antioxidante no ensaio de sequestro do radical hidroxila (SOUZA et al., 2007). Heteropolissacarídeos sulfatados, com diferentes conteúdos de ácido urônico e diferentes massas moleculares foram extraídos de *Sargassum fusiforme*, os mesmos apresentaram atividade sequestradora de radicais hidroxila e superóxido, tendo a mais potente atividade antioxidante o polissacarídeo com maior conteúdo de ácido urônico e menor massa molecular (ZHOU et al., 2008)

Recentemente, demonstrou-se polissacarídeos sulfatados de outra alga marrom com potencial antioxidante, a *Undaria pinnatifida*, os quais possuem excelente atividade sequestradora dos radicais superóxido e hidroxila e no teste do DPPH, além de ter uma moderada habilidade quelante de metal (HU et al., 2010).

Há também estudos sobre polissacarídeos sulfatados antioxidantes de algas vermelhas. Carragenanas iota (*Eucheuma spinosa*), kappa (*Eucheuma cottonii*) e lambda (*Gigartina acicularis*, *Gigartina pisillata*) apresentaram uma boa atividade em relação ao sequestro de radicais superóxido e hidroxila (SOUZA et al., 2007).

Polissacarídeos sulfatados da alga vermelha comestível *Gracilaria caudata* apresentaram excelente atividade quelante de metal, considerável atividade antioxidante pelo teste de CAT (capacidade antioxidante total), e ainda, moderada atividade para os testes de sequestro de radical superóxido, sequestro de radical hidroxila e ensaio de poder redutor (COSTA, 2008). Polissacarídeos sulfatados de *Gloiopeltis tenax* também tiveram excelente atividade pelo teste do DPPH, melhor que o ácido ascórbico (LIM; RYU, 2009).

Zhang et al. (2003) isolaram três frações polissacarídicas, denominadas de F1, F2 e F3, da alga vermelha *Phorphyra haitanensis* e observaram que estas frações apresentaram um alto poder de sequestro do radical superóxido e um efeito mais fraco no sequestro de radicais hidroxila, além de inibirem de forma significativa a peroxidação lipídica, e inibir parcialmente a hemólise de eritrócitos de ratos induzidas por peróxido de hidrogênio. Posteriormente, este mesmo grupo de pesquisa observou que a administração intraperitoneal de F1, também diminuiu significativamente a peroxidação lipídica em camundongos envelhecidos (ZHANG et al., 2004). Promoveram-se modificações químicas nos polissacarídeos da *P. haitanensis* (sulfatação, acetilação, benzoilação e fosforilação) e observou-se que esses derivados foram mais potentes que a porfirana nativa (ZHANG et al., 2009). Viu-se, ainda, que a atividade antioxidante desses polissacarídeos é dependente da massa molecular do polímero, sendo os mais ativos os com menores massas moleculares (ZHAO et al., 2006).

Em se tratando de algas verdes, apenas a alga *Ulva pertusa*, teve seus polissacarídeos sulfatados examinados em relação à atividade antioxidante *in vitro*. Um estudo realizado por Qi et al. (2005a) demonstraram claramente que ulvanas naturais, polissacarídeos sulfatados da alga verde *Ulva pertusa*, e seus derivados com alto teor de sulfato possuíam atividades antioxidantes (sequestro do radical hidroxila, superóxido, poder redutor e quelação férrica) (QI et al., 2005a). Além disso, ulvanas com alto teor de sulfato foram mais potentes que a ulvana natural (QI et al., 2005a). A ulvana natural (157.1 KDa) foi também degradada em polissacarídeos de menores massas moleculares (28.5, 64.5 e 50 KDa) e avaliou-se as atividades citadas acima. Os resultados indicaram que a massa molecular teve um efeito significativo sobre a atividade antioxidante da ulvana, já que a ulvana de

menor massa molecular apresentou a mais forte atividade antioxidante (QI et al., 2005b). Viu-se também que ulvanas modificadas pela adição de grupamentos benzoil e acetil mostraram excelente atividade antioxidante, principalmente para o ensaio de radicais superóxido, superior até a da vitamina C (QI et al., 2006).

A tabela 01 sumariza a atividade antioxidante dos polissacarídeos sulfatados naturais citados acima.

Tabela 01

Principais espécies de algas marinhas que tiveram seus polissacarídeos sulfatados naturais analisados em diferentes testes antioxidantes.

| Alga | CAT | Poder redutor | DPPH | Sequestro do radical OH [•] | Sequestro do radical O ₂ ^{-•} | Quelação férrica | Referência | |
|-------------|-----------------------|---------------|------|--------------------------------------|---|------------------|------------|------|
| Phaeophyta | <i>F. vesiculosus</i> | nd | + | nd | + | + | nd | A, B |
| | <i>L. japonica</i> | nd | + | + | + | + | + | C, D |
| | <i>P. gymnospora</i> | nd | nd | nd | + | + | nd | B |
| | <i>S. fusiforme</i> | nd | nd | nd | + | + | nd | E |
| | <i>U. pinnatifida</i> | nd | nd | + | + | + | + | F |
| Rhodophyta | <i>E. spinosa</i> | nd | nd | nd | + | + | nd | B |
| | <i>E. cottonii</i> | nd | nd | nd | + | + | nd | B |
| | <i>G. acicularis</i> | nd | nd | nd | + | + | nd | B |
| | <i>G. pisillata</i> | nd | nd | nd | + | + | nd | B |
| | <i>G. tenax</i> | nd | nd | + | nd | nd | nd | G |
| | <i>G. caudata</i> | + | + | nd | + | + | + | H |
| | <i>P. haitanensis</i> | nd | - | + | + | + | nd | I, J |
| Chlorophyta | <i>U. pertusa</i> | nd | + | nd | + | + | + | L |

A - RUPÉREZ; AHRAZEM; LEAL, 2002. B - SOUZA et al., 2007. C - WANG et al., 2008. D - WANG et al., 2010. E - ZHOU et al., 2008. F - HU et al., 2010. G - LIM; RYU, 2009. H - COSTA et al., 2008. I - ZHANG et al., 2003. J - ZHAO et al., 2006. L - QI et al., 2005a. +: apresenta atividade, -: não apresenta atividade, nd: não determinado.

O litoral potiguar, assim como o nordestino, é rico em várias espécies de algas marinhas. Contudo, poucos estudos foram realizados para se avaliar o potencial antioxidante dessas algas. O grupo do Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais da UFRN (BIOPOL) recentemente verificou-se a presença de extratos ricos em polissacarídeos sulfatados antioxidantes de algumas algas do litoral potiguar (*D. cervicornis*, *D. delicatula*, *D. menstrualis*, *D. mertensis*, *S. filipendula*, *S. scröderi*, *G. caudata*, *C. prolifera*, *C. sertularioides*, *C. cupressoides* e *C. isthmocladum*) (COSTA et al., 2010) e de polissacarídeos sulfatados da alga marrom *P. gymnospora* (SOUZA et al., 2007) e da alga vermelha *G. caudata* (COSTA et al., 2008). Porém, os estudos com algas verdes ainda está restrito a extratos ricos em polissacarídeos, não havendo relato de estudos com polissacarídeos purificados.

1.3 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS

1.3.1 Coagulação sanguínea x anticoagulantes

A formação do coágulo de fibrina envolve complexas interações entre proteases plasmáticas e seus cofatores, que culminam na gênese da enzima trombina, que, por proteólise, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel (FRANCO, 2001).

Em 1964, foi proposta a hipótese da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação. Este modelo descreve cada um dos fatores de coagulação como uma pró-enzima que pode ser convertida para uma enzima ativa. O mecanismo de coagulação é dividido em duas vias: via intrínseca, assim chamada porque todos os componentes estão presentes no sangue; e via extrínseca, em que a proteína da membrana das células subendotélias, o fator tecidual (FT), é necessária, além de componentes circulantes. Como é apresentada na figura 03, a via extrínseca é desencadeada pela formação do complexo Fator Tecidual (FT): Fator VIIa (FVIIa) que resulta na ativação do fator X. A via intrínseca é iniciada pela ativação do fator XII (FXII), quando o sangue entra em contato com qualquer superfície contendo

cargas negativas (ativação por contato), este processo requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serino-protease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O fator XII ativo (FXIIa), desencadeia uma série de ativações protéicas, que culmina na ativação do fator X (RIDEELL et al., 2007).

O ponto de convergência das vias extrínseca e intrínseca é conhecido como via comum da coagulação, e é caracterizada pela ativação de fibrinogênio à fibrina pela trombina, formando uma malha de fibrina que vai ser estabilizada pelo fator XIIIa (FRANCO, 2001).

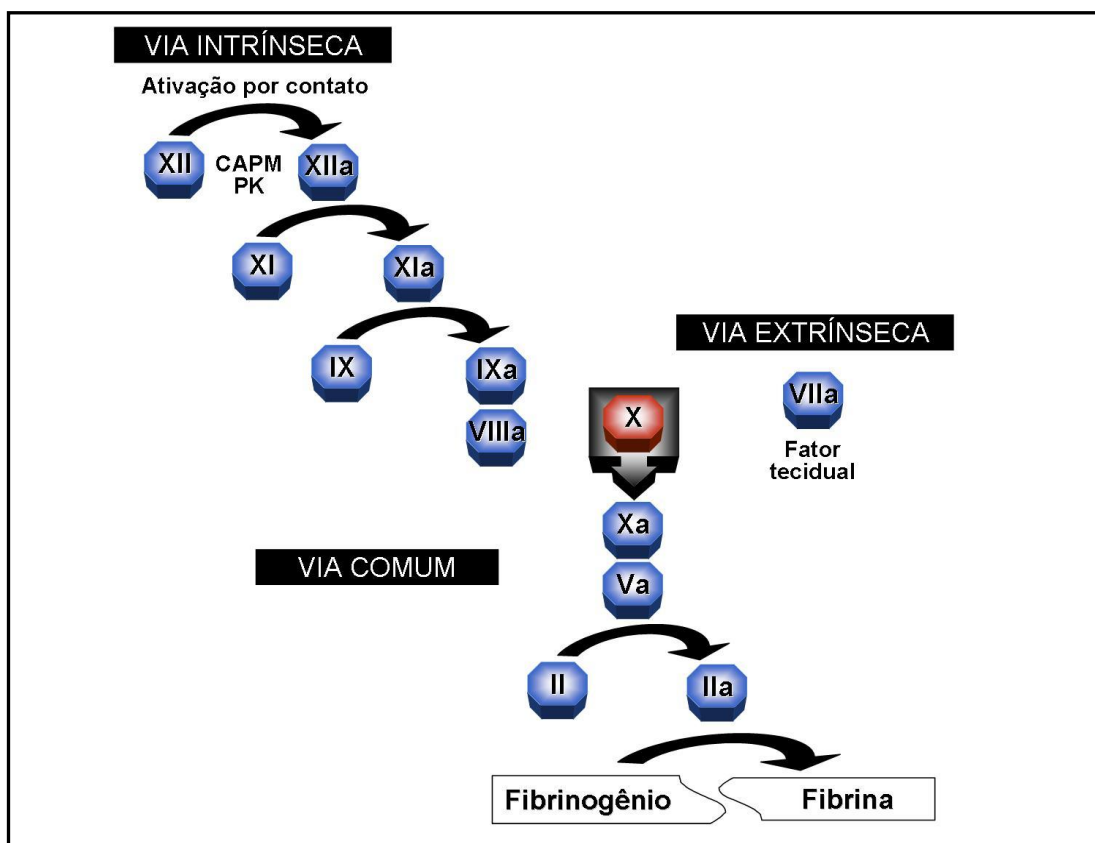


Figura 03: Modelo clássico da cascata de coagulação.
Fonte: Adaptado de FRANCO, 2001.

Posteriormente, foi proposto um novo modelo de cascata de coagulação, no qual são relacionados três complexos enzimáticos pró-coagulantes que vão culminar na ativação da trombina: Complexo “tenase” extrínseco, complexo “tenase” intrínseco e complexo protrombinase. Após uma lesão no endotélio vascular, o FT é exposto e se liga ao Fator VIIa que é normalmente encontrado no sangue. O

complexo FT/VIIa ativa os fatores IX e X na presença do cálcio. O fator IXa, por sua vez, potencializa a formação de Xa através da formação do “complexo tenase intrínseco”. Por fim, o fator Xa forma complexo com o fator Va convertendo o fator II (protrombina) em fator IIa (trombina), como observado na figura 04 (FRANCO, 2001 ADAMS; BIRD, 2009).

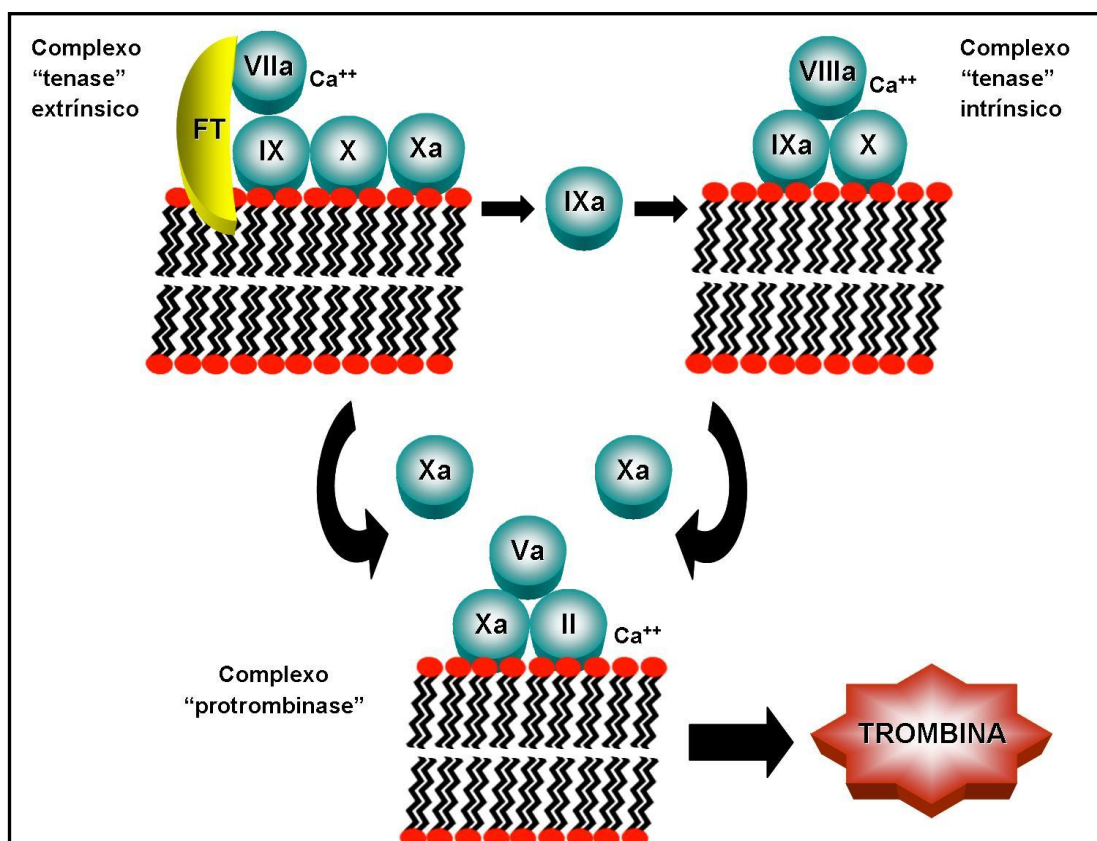


Figura 04: Novo modelo da cascata de coagulação.
Fonte: Adaptado de FRANCO, 2001.

Anticoagulantes têm sido amplamente utilizados para o tratamento de sangue durante diálises e cirurgias; como medicamentos em várias doenças, como coagulação intravascular disseminada e trombose; e para testes sanguíneos *in vitro* (WANG et al., 2010).

O principal fármaco anticoagulante, usado há mais de 80 anos, é a heparina, um polissacarídeo sulfatado de origem animal, extraído de intestino de suínos e pulmão de bovinos, constituído por unidades dissacarídicas repetitivas, onde um dos resíduos é uma hexosamina (glucosamina); e o outro, um ácido urônico (L-idurônico e D-glucurônico), a sulfatação pode ocorrer em vários pontos da molécula (NADER

et al., 2004). No entanto, o uso deste composto pode apresentar algumas reações adversas, como trombocitopenia decorrente do seu uso prolongado (FABRIS et al., 2000) e efeito hemorrágico residual, apresentado por fragmentos da heparina sem atividade anticoagulante (NADER et al., 1979; 2004). Portanto, se faz necessário a busca por novos compostos anticoagulantes, com menores efeitos colaterais ou sem efeitos colaterais, que possam vir a substituir a heparina, ou o seu uso em algumas situações específicas.

1.3.2 Polissacarídeos sulfatados anticoagulantes de algas marinhas

Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas têm uma grande variedade de atividades biológicas, mas a sua ação anticoagulante é a mais amplamente estudada. Eles apresentam-se como promissores fármacos para a substituição da heparina, devido principalmente, a sua grande diversidade estrutural, o que fornece a possibilidade deles apresentarem mecanismo de ação diferente da heparina, e também devido ao fato de as algas marinhas serem abundantes na natureza e serem recursos naturais renováveis, havendo a possibilidade de serem cultivadas, caso necessário (ROCHA et al., 2006).

A ação anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados reside, principalmente, na potencialização dos inibidores naturais (antitrombina e cofator II da heparina) das proteases do plasma (trombina e fator Xa). Esses biopolímeros podem agir em dois mecanismos distintos: induzindo a mudança alostérica nas serpinas (antitrombina e cofator II da heparina) ou a cadeia do polissacarídeo sulfatado pode atuar como uma "ponte", reunindo a protease a serpina (NADER et al., 2004). No entanto, há casos de polissacarídeos sulfatados que exibem um efeito anticoagulante independente de serpinas, por exemplo, inibindo diretamente a atividade da trombina (MATSUBARA et al., 2001; MAO et al., 2006); contudo, esses autores não foram capazes de explicar por qual mecanismo o polissacarídeo sulfatado inibia a trombina, ou seja, se ele se ligava ao sítio catalítico da trombina ou se ligava-se a algum outro sítio da protease.

Em 1936 foi feito o primeiro relato de um polissacarídeo sulfatado anticoagulante, uma galactana sulfatada extraída da alga vermelha *Iridaea*

laminarioides (CHARGAFF; BANCROFT; STANLEY-BROWN, 1936). A partir de então, foi crescente o interesse em se estudar polissacarídeos sulfatados anticoagulantes de algas marinhas. Sendo os mais bem estudados os extraídos das algas marrons (ALBUQUERQUE et al., 2004; AZEVEDO, 2009; SILVA et al., 2005; ATHUKORALA et al., 2007; MEDEIROS et al., 2008) e vermelhas (ROCHA et al., 2006).

Apesar de o primeiro relato de polissacarídeos sulfatados anticoagulantes de algas marinhas ter sido feito em 1936 (CHARGAFF; BANCROFT; STANLEY-BROWN, 1936), só em 1985 verificou-se a presença de polissacarídeos sulfatados com atividade anticoagulante em algas verdes (DEACON-SMITH; LEE-POTTER; ROGERS, 1985).

Dentre as Chlorophyta, as espécies da família Codiaceae são as que possuem polissacarídeos sulfatados anticoagulantes mais estudados. Esses polímeros podem prolongar o tempo de coagulação nos ensaios de aPTT e/ou TT, ou seja, atuando nas vias intrínseca e/ou comum da cascata de coagulação, respectivamente (JURD et al., 1995; MATSUBARA et al., 2000). Por outro lado, poucos polissacarídeos de Codiaceae possuem a capacidade de prolongar o tempo de coagulação pelo ensaio de PT (via extrínseca). Atividade anticoagulante para este teste foi observada para extratos de polissacarídeos sulfatados de *C. dwarkense*, *C. indicum*, *C. tomentosum* e *C. geppi* da costa da Índia (SHANMUGAM et al., 2002) e para polissacarídeos sulfatados purificados da *Codium dwarkense* (SIDDHANTA et al., 1999; SHANMUGAM et al., 2001). O mecanismo de ação de polissacarídeos de Codiaceae pode ser potencializando a ação da antitrombina (AT) e/ou cofator II da heparina (HCII) e/ou inibindo diretamente a trombina. A atividade anticoagulante de espécies de *Codium* está sumarizada na tabela 02.

Polissacarídeos de algas do gênero *Monostroma* também vem sendo estudados (tabela 02). Uma atividade relativamente alta em inibir a trombina foi encontrada para extratos de polissacarídeos sulfatados de *Monostroma nitidum* (MAEDA et al., 1991). Este polissacarídeo ativo foi purificado por cromatografia de troca-iônica e gel filtração, obtendo-se um homopolissacarídeo (ramnana sulfatada), tendo a capacidade inibir a trombina seis vezes maior que a heparina (HARADA; MAEDA, 1998). Dois polissacarídeos sulfatados ricos em ramnose, com pequenas

quantidades de glicose e xilose, foram obtidos desta mesma alga por Mao et al. (2008), os mesmos apresentaram alta atividade anticoagulante pelos testes de aPTT e TT e foram potentes inibidores da trombina mediado pelo HCII.

Ramnana sulfatada anticoagulante também foram descritas para alga *Monostroma latissimum* (LEE et al., 1998). Zhang et al. (2008) extraíram e fragmentaram por degradação com H₂O₂ um polissacarídeo sulfatado (725.4 kDa) da *M. latissimum*, obtendo 5 fragmentos com 216.4, 123.7, 61.9, 26.0 e 10.6 KDa, com composição e estrutura química similares. Os mesmos tiveram atividade anticoagulante pelo testes de aPTT e TT, sendo os polissacarídeos mais potentes os com menores massas moleculares.

Polissacarídeos sulfatados ricos em ramnose extraídos da *Ulva conglobata* agem inibindo diretamente a trombina ou potencializando a ação do HCII (MAO et al., 2006). Já espécies de Caulerpaceae, como a *C. okamurai* e *C. brachypus*, também possuem polissacarídeos sulfatados anticoagulantes, os quais são ricos em galactose e têm um efeito específico na inibição da trombina dependente do HCII (HAYAKAWA, 2000).

A grande diversidade de algas do litoral potiguar, inclusive de algas verdes, e os poucos estudos com os polissacarídeos sulfatados destas algas, fez com que há algum tempo o grupo do BIOPOL aumentasse o seu interesse por compostos extraídos de Chlorophyta. E, em trabalho recente, foi estudada a atividade anticoagulante de extratos ricos em polissacarídeos sulfatados de 11 algas marinhas do litoral do Rio Grande do Norte, destas 4 foram algas verdes (*Caulerpa cupressoides*, *Caulerpa prolifera*, *Caulerpa sertularioides* e *Codium isthmocladum*). Todos os extratos obtidos das algas verdes apresentaram atividade anticoagulante pelo teste de aPTT, e, interessante, das 11 espécies estudadas, o extrato da *C. cupressoides* foi o único que teve a capacidade de prolongar o tempo de coagulação no teste de PT (COSTA et al., 2010).

Tabela 02
Polissacarídeos sulfatados de algas verdes com atividade anticoagulante.

| Alga | Composição química | aPTT | PT | TT | Ação na AT | Ação no HCII | Inibição direta da trombina | Referência |
|-----------------------|--|------|----|----|------------|--------------|-----------------------------|------------|
| <i>C. adhaerence</i> | xiloglucoroabinana sulfatada | nd | nd | nd | + | + | - | A |
| <i>C. cylindricum</i> | glucogalactana sulfatada | + | - | + | - | - | + | B |
| <i>C. divaricatum</i> | xiloglucoroabinana sulfatada | nd | nd | nd | + | + | - | A |
| <i>C. dwarfkense</i> | arabinana sulfatada / galactoarabinana sulfatada | + | + | + | nd | nd | nd | C |
| <i>C. fragile</i> | polissacarídeo sulfatado | + | - | + | - | + | - | D |
| | xiloarabinana sulfatada | nd | nd | nd | + | + | - | A |
| | glicoarabinogalactomanana sulfatada | + | - | + | nd | nd | nd | E |
| <i>C. ishmocladum</i> | arabinomanogalactanas sulfatadas / galactanas sulfatadas | + | - | nd | nd | nd | nd | F |
| <i>C. latum</i> | arabinana sulfatada | nd | nd | nd | nd | nd | + | G |
| | arabinana sulfatada | nd | nd | nd | + | + | - | A |
| <i>C. vermilara</i> | glicoarabinogalactomanana sulfatada | + | - | + | nd | nd | nd | E |
| <i>C. brachypus</i> | galactana sulfatada | nd | nd | nd | - | + | - | A |
| <i>C. okamurai</i> | manoxilogalactana sulfatada | nd | nd | nd | - | + | - | A |
| <i>M. latissimum</i> | ramnana sulfatada | nd | nd | nd | nd | nd | + | H |
| | glucuronoglucoxiloramnana sulfatada | nd | nd | nd | + | + | - | A |
| | xiloglucoramnana sulfatada | + | - | + | nd | nd | nd | J |
| | xiloglucoramnana sulfatada | + | - | + | + | + | - | J |
| Monostromataceae | glucuronoglucoxiloramnana sulfatada | nd | nd | nd | nd | nd | + | L |
| | ramnana sulfatada | nd | nd | nd | nd | nd | + | M |
| | glucuronoglucoxiloramnana sulfatada | nd | nd | nd | + | + | - | A |
| | xilogalactoglucoxiloramnana sulfatada | + | - | + | + | + | + | N |
| | manoxiloglucoramnana sulfatada | + | - | + | + | + | + | N |
| <i>U. conglobata</i> | glucofuroramanas sulfatadas | + | nd | nd | + | + | + | O |

A - HAYAKAWA et al., 2000. B - MATSUBARA et al., 2001. C - SIDDHANTA et al., 1999. D - JURD et al., 1995. E - CIANCIA et al., 2007. F - FARIAS, 2006. G - UEHARA; TAKESHITA; MAEDA, 1992. H - LEE et al., 1998. I - ZHANG et al., 2008. J - MAO et al., 2009. L - MAEDA et al., 1991. M - HARADA; MAEDA, 1998. N - MAO et al., 2008. O - MAO et al., 2006. +: apresenta atividade, -: não apresenta atividade, nd: não determinado.

As atividades biológicas, inclusive a atividade anticoagulante e antioxidante, dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas são dependentes de vários parâmetros estruturais, como o grau de sulfatação (HAROUN-BOUHEDJA et al., 2000; QI et al., 2005a; AZEVEDO, 2006; WANG et al., 2008), a massa molecular (ZHAO et al., 2006; ZHANG et al., 2008), a posição da sulfatação (FARIAS et al., 2000; ROCHA et al., 2006; POMIM; MOURÃO, 2008; FONSECA et al., 2008) e o tipo de açúcar (SHANMUGAM; MODY, 2000). O que demonstra a importância do conhecimento da estrutura dos polissacarídeos de algas, mesmo que parcial, para se determinar a relação estrutura e atividade biológica desses polímeros.

1.4 CARBOIDRATOS X SAZONALIDADE E PARÂMETROS AMBIENTAIS

Diferente de proteínas e ácidos nucleicos, polissacarídeos não possuem um molde para a sua construção, dessa forma cada polissacarídeo sintetizado apresenta uma variabilidade em torno de uma estrutura principal, o que faz com que moléculas do mesmo composto apresentem características físico-químicas ligeiramente diferentes entre si (NELSON; COX, 2002). Vários fatores podem influenciar na síntese de polissacarídeos sulfatados em organismos vivos, como abastecimento de alimentos, mudanças sazonais e fatores abióticos (temperatura, correntes marítimas, exposição de luz, salinidade).

Na década de 80, Nader e colaboradores investigaram a correlação entre quantidade de polissacarídeos sulfatados, conhecidos como glicosaminoglicanos (GAG's), com a salinidade da água, para tanto selecionaram espécies semelhantes de três grupos de invertebrados (Crustacea, Pelecypoda e Gastropoda) provenientes de habitat de diferentes salinidades e verificaram que há correlação direta entre logaritmo da concentração de GAG's e o grau de salinidade do habitat (NADER et al., 1983). Mais recentemente, uma pesquisa realizada com o ouriço do mar *Lytechinus variegatus* demonstrou que essa espécie produz uma fucana sulfatada durante todas as estações do ano, denominada de P1, e que no inverno além da P1 o ouriço produz outro tipo de fucana sulfatada, a P2, ambas com estruturas distintas. Aparentemente há uma correlação entre temperatura da água do mar e a síntese da P2 (CINELLI et al., 2007).

Além disso, de acordo com Aquino et al. (2005), a ocorrência de polissacarídeos sulfatados de angiospermas marinhas resulta da adaptação fisiológica, devido à pressão ambiental, principalmente da salinidade, uma vez que estão ausentes nas plantas terrestres e de água doce (AQUINO et al., 2005).

Em se tratando de algas marinhas, alguns estudos demonstram que a composição química de certas espécies é afetada por parâmetros abióticos. Estudo realizado durante um ano com algas vermelhas *Grateloupia doryphora* e *Gymnogongrus griffithsiae* demonstrou que o conteúdo de carboidratos dessas espécies aumenta gradualmente durante a primavera, tornando-se maior no verão; período onde se observa os maiores valores de salinidade, temperatura e intensidade luminosa (PERFETO, 1998). Esse resultado se assemelha ao obtido para as algas *Gracilaria gracilis* e *Gracilaria bursa pastoris*, no qual o rendimento do agar variou significativamente de acordo com a sazonalidade, sendo os maiores rendimentos obtidos na primavera e no verão, respectivamente. Sendo essa variável também correlacionada positivamente com a salinidade e temperatura da água do mar (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003).

Houve também uma correlação positiva entre a produção de carboidratos e a temperatura e salinidade da água para alga vermelha *Gracilaria cervicornis* e entre o conteúdo de carboidratos e a salinidade para alga marrom *Sargassum vulgare* (MARINHO-SORIANO et al., 2006). Essas correlações entre a salinidade e temperatura e o conteúdo de carboidratos totais e de agar, sugere que esses dois parâmetros ambientais podem influenciar no metabolismo de carboidratos.

Além disso, o teor de sulfato também pode ser influenciado por fatores abióticos, por exemplo, a quantidade de sulfato do agar das algas *Gracilaria gracilis* e *Gracilaria bursa pastoris* foi correlacionado negativamente com salinidade (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003).

Com relação a polissacarídeos sulfatos de algas marinhas, que não o agar, foi observado que a sazonalidade pode ou não influenciar a estrutura de polissacarídeos sulfatados. Laminaranas e galactofucanas foram extraídas da alga marrom *Saccharina longicuris* em quatro períodos (maio, agosto e novembro de 2005 e junho de 2006) e verificou-se que havia uma diferença significativa no rendimento e composição monossacarídica entre maio 2005 e junho 2006, além de

haver também uma diferença significativa no teor de sulfato da galactofucana entre 2005 e 2006, no entanto, esta diferença não estava correlacionada com a temperatura e salinidade da água, já que esses parâmetros se mantiveram constante durante o período de estudo (RIOUX; TURGEON; BEAULIEU, 2009). Mudanças sazonais no conteúdo de fucose e sulfato também foram observadas para fucanas da alga marrom *Laminaria japonica* (HONYA et al., 1999), no entanto, neste caso, parâmetros ambientais não foram estudados.

O contrário foi observado para a alga vermelha *Delesseria sanguinea*, a qual não teve sua composição monossacarídica nem conteúdo de sulfato alterado com sazonalidade (GRÜNEWALD; GROTH; ALBAN, 2009). Já Zhang et al. (2005) investigaram os polissacarídeos sulfatados, da alga *Porphyra capensis* coletada em dois lugares diferentes (Namíbia e África do Sul) e verificaram que não havia diferença no teor de açúcar e de sulfato dos polissacarídeos quando provenientes da mesma espécie coletada em locais diferentes, porém havia uma ligeira variação sazonal no conteúdo de sulfato, mas de acordo com os mesmos, são necessários mais estudos para confirmar esse dado de sazonalidade já que o número de amostras (meses) estudadas foi pouco (ZHANG et al., 2005). No entanto, esses autores não avaliaram a influência de fatores abióticos, como a salinidade e temperatura, sobre os polissacarídeos sulfatados produzidos por essas algas

Estes dados indicam que a sazonalidade, bem como, parâmetros ambientais podem afetar de forma diferente a estrutura de polissacarídeos sulfatados de acordo com a espécie da alga. No entanto, não existem estudos mostrando a influência da salinidade da água do mar na estrutura e conseqüentemente nas atividades biológicas destes biopolímeros de algas verdes.

Com base nessas considerações, o objetivo principal desta pesquisa foi avaliar o efeito da salinidade da água do mar no rendimento e na composição de frações polissacarídicas da alga verde *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*, coletada em duas praias de diferentes salinidades do litoral do Rio Grande do Norte, bem como verificar a influência da salinidade sobre as atividades biológicas destas frações. E os objetivos específicos foram:

- Determinar a composição centesimal da alga *C. cupressoides*;

- Obter frações ricas em polissacarídeos sulfatados da alga *C. cupressoides*, coletada na praia de Búzios (Nísia Floresta/RN) e na praia de Camapum (Macau/RN);
 - Realizar a caracterização das frações polissacarídicas através de métodos físicos, químicos e físico-químicos;
 - Avaliar a atividade antioxidante das frações polissacarídicas através de diferentes sistemas *in vitro*;
 - Analisar a atividade anticoagulante das frações polissacarídicas através de “kits” comerciais de aPTT e PT;
 - Comparar a composição química e as atividades biológicas (anticoagulante e antioxidante) das frações polissacarídicas da *C. cupressoides* coletada em Macau com as frações polissacarídicas da mesma espécie coletada em Búzios, onde a salinidade é menor.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. LOCAIS DE COLETA

A coleta da alga objetivo de estudo deste trabalho foi realizada em duas praias do litoral potiguar: Camapum e Búzios (figura 05).

A praia de Búzios pertence ao município de Nísia Floresta, no litoral sul do Rio Grande do Norte, a 38 Km de Natal. Está localizada a uma latitude sul $05^{\circ}58'23''$ e longitude oeste $35^{\circ}04'97''$. Nesta área, a temperatura média do ar é de 28° C, a precipitação pluviométrica é de 1300 mm. A praia é relativamente rasa, de fundo arenoso, em muitos pontos cobertos por algas calcárias e protegida do embate das ondas pelos arrecifes. Esta praia possui uma vasta diversidade de algas com grande número de espécies de Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyta (FONSECA, 2001).

O segundo local de coleta, a praia de Camapum, pertence ao Município de Macau, distante 180 Km de Natal e localizado na subzona salineira do Rio Grande do Norte. Está localizada a uma latitude sul $5^{\circ}05'19''$ e longitude oeste $36^{\circ}37'78''$. Nesta área, a temperatura média do ar é de $27,2^{\circ}$ C, a precipitação pluviométrica é de 390 mm. Camapum é considerada uma praia urbana com águas claras e raras (CONHEÇA MACAU, 2010).

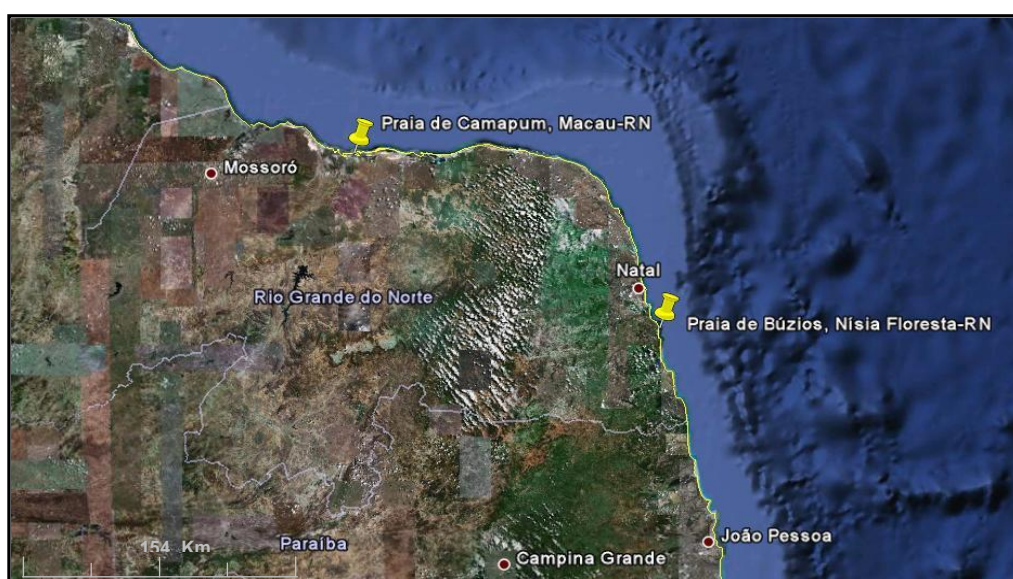


Figura 05: Localização dos pontos de coleta da *C. cupressoides* no litoral do Rio Grande do Norte.

Fonte: Programa Google Earth 3.0 (Google Inc.© 2005).

2.2 MATERIAIS

2.2.1 Material Biológico

Filo: Chlorophyta

Classe: Ulvophyceae

Ordem: Bryopsidales

Família: Caulerpaceae

Gênero: *Caulerpa*

Espécie: *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*



Figura 06: Alga verde *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata* utilizada neste trabalho.

Fonte: Autoria própria.

Como objeto deste estudo foi escolhida a alga verde *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata* Børgesen 1907 (figura 06), devido ser uma espécie facilmente encontrada nas praias de Camapum (Macau/RN) e Búzios (Nísia Floresta/RN), além de ser de fácil coleta e ser abundante. O estudo se restringiu às algas fixas ao substrato arenoso na zona entre marés (mesolitoral), em ambas as praias. Os

espécimes de *C. cupressoides* foram coletados em novembro de 2008, durante maré baixa entre 0,0-0,2m, e foram identificados pela Prof^a Dr^a Eliane Marinho Soriano, do Departamento de Oceanografia e Limnologia da UFRN.

Após coleta, as algas foram acondicionadas em sacos de polietileno, levadas ao laboratório (BIOPOL) no mesmo dia da coleta, lavadas em água corrente, examinadas cuidadosamente para que ficassem livres de epífitas, inclusões calcárias e sais, e então, foram postas para secar em estufa aerada a 45° C. Em seguida, foram trituradas, pesadas e guardadas em frascos hermeticamente fechados. Denominou-se de CCM a alga coletada na praia de Camapum e de CCB a alga coletada na praia de Búzios.

2.2.2 Outros materiais

- Acetona, ácido acético, ácido sulfúrico, álcool etílico, álcool metílico, azul de toluidina, brometo de potássio, brometo de cetiltrimetilamônio P.A. (CETAVLON), citrato de sódio, cloreto de bário, clorofórmio, coomasie brilliant blue R 250, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, glicina, hidróxido de sódio, peróxido de hidrogênio e sulfato de ferro heptahidratado da CRQ (Diadema, SP, Brasil);
- Ácido bórico, gelatina e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) da VETEC (Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Ácido clorídrico e metionina da Synth (Diadema, SP, Brasil);
- Ácido gálico da CAQ Casa da Química Ind. e Com. (Diadema, SP, Brasil);
- Ácido ascórbico, azul de dimetilmetileno (DMB), carbazol, cloreto de sódio, dextrans de 40 KDa, 70 KDa, 147 KDa e 500 KDa, 1,3 diamino propano acetato, ferrozina, heparina, nitroblue tetrazolium (NBT) e riboflavina da Sigma-Aldrich Brasil (São Paulo, SP, Brasil);
- Agarose (Standart L'ow-MR) da BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA);
- Cloreto de ferro e reagente de Folin-Ciocalteu da Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Clexane® (enoxaparina sódica) da Aventis Intercontinental (Maisons, Alfort, França);

- Fenol, molibdato de amônia, sulfato de cobre, sulfato de potássio e sulfato de sódio anidro da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- L-fucose, D-xilose, D-galactose, D-manose, D-glucose, D-arabinose, D-ramnose e ácido D-glucurônico da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA);
- “Kit” de tempo de tromboplastina parcial ativada e “kit” de tempo de protrombina da Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil);
- Maxatase (protease alcalina P 126) da BIOCON do Brasil Industrial LTDA (Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Salicilato de sódio da FLUKA (Steinheim, Germany);
- Sephadex G-100 da GE Healthcare (São Paulo, SP, Brasil).

Todos os demais materiais e reagentes utilizados foram da melhor qualidade disponível.

2.2.3 Aparelhos

Além dos aparelhos usuais do laboratório pode-se destacar:

- Agitador de tubos mod. AP 56 da Phoenix Ltda. (Araraquara, SP, Brasil);
- Balanças analítica e de precisão da TECNAL (Piracicaba, SP, Brasil);
- Banho maria de temperatura ajustável da FANEM Ltda (São Paulo, SP, Brasil);
- Bomba de vácuo da TECNAL (Piracicaba, SP, Brasil);
- Bomba peristáltica da Fischer Scientific (Suwanee, GA, EUA).
- Câmara para eletroforese em gel de agarose, modelo desenvolvido por Jaques e col. (1968) da Técnica Permatron Ltda (São Paulo, SP, Brasil);
- Centrífuga refrigerada CR 21 da Hitachi Koki Co. Ltda (Tóquio, Japão);
- Coagulômetro da Drake (São Paulo, SP, Brasil).
- Cromatógrafo líquido Elite Lachrom da Hitachi (Tóquio, Japão);
- Destilador de água MA-270 da Marconi Ltda (Piracicaba, SP, Brasil);
- Espectrofotômetro de infravermelho da PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, EUA);
- Espectrofotômetro da FEMTO Ltda (São Paulo, SP, Brasil);
- Estufa da Odontobrás Ltda. (Ribeirão Preto, SP, Brasil);

- Fontes de corrente contínua da BioAgency Biotecnologia Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Medidor de pH da PHS-3B da PHTEK (Japão);
- Purificador de água Milli-Q[®] Water System da Millipore Corp. (Bedford, MA, USA);
- Refratômetro portátil modelo RTS 101ATC da Instrutherm (Freguesia do Ó, SP, Brasil);
- Termômetro centígrado da Incoterm (Porto Alegre, RS, Brasil).

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Determinação da salinidade e da temperatura da água do mar

A salinidade (‰) e a temperatura (° C) da água do mar foram determinadas 30 e 15 dias antes da coleta e 15 e 30 dias após a coleta, bem como, simultaneamente durante a coleta. A salinidade foi obtida por intermédio de um refratômetro portátil, modelo RTS 101ATC da Instrutherm e a temperatura foi verificada com auxílio de um termômetro de mercúrio centígrado.

2.3.2 Determinação da composição centesimal da *C. cupressoides*

A determinação da composição centesimal da alga *C. Cupressoides* foi realizada no Laboratório da Nutrição e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da UFRN. Os parâmetros analisados foram: proteínas, lipídios, cinzas, fibras e carboidratos (n=3). Os métodos utilizados na determinação de cada um desses parâmetros estão relacionados abaixo:

2.3.2.1 Proteína Bruta

Para determinação da proteína bruta foi utilizado o método semi-micro Kjeldhal, conforme recomendação da AOAC (1985), descrita por Santos (2007). 100 mg da alga, previamente dessecada, foi colocada em balão de Kjeldahl de 50 mL. Ao balão foram adicionados os catalisadores (0,5 g de sulfato de cobre e 1,0 g de

sulfato de potássio) e finalmente 5 mL de ácido sulfúrico. O balão foi conduzido ao digestor de Kjeldahl até a completa mineralização, que corresponde à formação de um líquido translúcido de cor verde azulada. Após a digestão, o material foi transferido para o aparelho de destilação ao qual foi adicionado hidróxido de sódio a 40% até saturação. O produto da destilação foi coletado em um erlenmeyer contendo 10 mL da solução de ácido bórico saturada e 3 gotas do indicador. A destilação foi levada a efeito até que o material do erlenmeyer atingisse um volume de 50 mL. Foi, então, realizada a titulação com ácido sulfúrico 0,02 N, aplicando-se o valor do volume titulado na seguinte fórmula:

$$V \times \text{normalidade} \times \text{fator do ácido} \times 14,01$$

$$\text{Nitrogênio total} = \frac{\text{_____}}{\text{massa da amostra em gramas}}$$

Sendo o teor de proteínas da amostra, igual a 6,25 x nitrogênio total.

2.3.2.2 Lipídios

Para verificação do teor de lipídios 1 g da alga pulverizada foi colocado em um erlenmeyer com rolha e adicionados ao mesmo 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada na proporção 1:2:0.8, respectivamente. Em seguida, o erlenmeyer foi arrolhado e agitado por 30 minutos em um agitador rotativo a 145 g. Posteriormente, foram acrescentados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de sulfato de sódio anidro 1,5%, este material ficou sob homogeneização por 2 min. Formaram-se duas camadas, uma hidrofílica e uma hidrofóbica, a qual continha os lipídios. Foram transferidos 15 mL da camada hidrofóbica para um tubo cônico com rolha esmerilhada de 30 mL, a este foi adicionado 1 g de sulfato de sódio anidro, sendo o material em seguida filtrado. Transferiu-se 5 mL do filtrado para um becker de 50 mL previamente pesado e levou-se à estufa a 100° C até completa evaporação do solvente. Após secagem e resfriamento em dessecador, o becker foi pesado e o percentual de lipídios foi calculado a partir da massa dos lipídios encontrado no volume de 5 mL (m), de acordo com a fórmula abaixo (BLIGH; DYER, 1959):

$$\% \text{ Lipídios totais} = \frac{\text{m x 4 x 100}}{\text{g amostra}}$$

2.3.2.3 Cinzas

A fração cinza foi determinada conforme recomendação da AOAC (1985), descrita por Fonseca (2001). 1,5 g da alga pulverizada foram colocados em cadinho de porcelana, previamente tarado. Em seguida, o cadinho com a amostra foi submetido à temperatura de 550° C em mufla por 6 h, até destruição total da matéria orgânica, momento em que a amostra apresentou coloração esbranquiçada, sem pontos negros que indiquem a presença de carvão (resíduo de matéria orgânica). Em seguida, a mufla foi resfriada até a temperatura próxima de 50° C para que pudesse ser retirado o cadinho com a amostra. Este foi levado a um dessecador para entrar em equilíbrio térmico com o ambiente. Posteriormente, o cadinho foi pesado e a diferença entre a massa do cadinho antes e após a incineração da amostra forneceu a quantidade de cinzas.

2.3.2.4 Fibras

A quantidade de fibras das algas foi estimada segundo a AOAC (1985). Inicialmente, as amostras foram delipidadas de acordo com o seguinte procedimento: Pesou-se 9 g da alga pulverizada e adicionou-se 30 mL de clorofórmio e 60 mL de metanol, deixou-se em repouso por 1 h. Posteriormente, adicionou-se 24 mL de água destilada, filtrou-se e deixou-se na estufa até secar. Pesou-se 1 g do material delipidado em um becker e adicionou-se 20 mL de água destilada. Deixou-se o becker sob agitação em banho maria a 37 °C por 90 min e adicionou-se 100 mL de etanol 95%. Em seguida, o material foi filtrado a vácuo em cadinho de Gooch com lã de vidro, previamente pesado, sendo posteriormente o resíduo lavado com 40 mL de etanol 78%, 10 mL de etanol 95% e 10 mL de acetona. Após lavagem do resíduo o cadinho foi posto em estufa a 105° C até peso

constante. A quantidade de fibras na amostra foi estimada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%Fibra = 100 \times (RT - (P + A) / 100 \times RT) / Pa$$

Onde, RT= mg resíduo; P=% de proteína; A=% cinza e Pa=mg amostra.

2.3.2.5 Estimativa de Carboidratos

A quantidade de carboidratos das algas foi estimada por diferença a partir dos demais componentes da composição centesimal (proteínas, lipídios, fibras e cinzas), segundo normas da AOAC (1985), descritas por Santos 2007.

2.3.3 Extração das frações polissacarídicas da alga verde *C. cupressoides*

2.3.3.1 Obtenção do pó cetônico

As algas secas e pulverizadas foram tratadas quatro vezes com dois volumes de acetona para despigmentação e delipidação do material. A acetona foi decantada e o resíduo colocado para secar a 45° C sob aeração. Posteriormente, aferiu-se novamente o peso seco do material, que se convencionou chamar de pó cetônico.

2.3.3.2 Proteólise

Com o intuito de promover a extração dos polissacarídeos sulfatados e eliminar os contaminantes protéicos, foram adicionados ao pó cetônico dois volumes de NaCl 0,25 M, sendo o pH ajustado para 8,0. A este material, foi adicionada a enzima proteolítica maxatase (15 mg por grama de pó cetônico), e o material foi incubado a 60° C “overnight”. A suspensão foi, em seguida, centrifugada a 8.000 g por 15 minutos. O precipitado foi desprezado e o volume do sobrenadante foi medido e guardado a 4° C.

2.3.3.3 Fracionamento com volumes crescentes de acetona PA

O sobrenadante obtido após a proteólise foi fracionado com volumes crescentes de acetona, obtendo-se as frações polissacarídicas. Os valores de acetona adicionados foram determinados pela turvação da solução, que caracteriza a precipitação de polissacarídeos devido à adição desse solvente polar. Adicionou-se um volume de acetona, sob agitação leve, necessário para que se visualizasse uma turvação da solução, essa solução foi mantida em repouso a 4° C durante 18 h, o precipitado foi coletado por centrifugação a 8.000 g por 15 min a 4° C e seco a pressão reduzida. Em seguida, esse procedimento foi repetido até que não se visualizasse mais a formação de precipitado (ROCHA, 1998).

2.3.4 Caracterização das frações polissacarídicas da alga *C. cupressoides*

2.3.4.1 Eletroforese em gel de agarose

Para visualização dos polissacarídeos sulfatados obtidos após o fracionamento com acetona, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose. O preparo das lâminas passa pela pesagem do gel de agarose (0,6%) e diluição no tampão 1,3 diamino propano acetato (PDA) 0,05 M, pH 9,0. Alíquotas de 5 µL de cada fração na concentração de 10 µg/µL foram aplicadas em canaletas no gel e submetidos à eletroforese em cuba resfriada a 4° C. Após a corrida eletroforética (a 100 volts), os compostos foram precipitados com CETAVLON 0,1% por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi seco sob uma corrente de ar quente e corado com azul de toluidina 0,1%, numa solução de ácido acético 1% e etanol 50%. O excesso de corante foi removido utilizando-se uma solução de ácido acético 1% em etanol 49% (solução descorante). A operação foi repetida até completo descoloramento do fundo da lâmina. A seguir, o gel foi seco à temperatura ambiente (DIETRICH; DIETRICH, 1976).

A revelação das bandas de migração foi feita pela atividade metacromática característica de cada composto. Neste caso, os compostos ricos em sulfato desenvolvem uma coloração roxa característica.

2.3.4.2 Análises químicas

- Açúcares totais

Para se verificar a quantidade de polissacarídeos nas frações realizou-se a determinação de açúcares totais pelo método fenol/ácido sulfúrico, utilizando-se a galactose como padrão, sendo as leituras realizadas a 490 nm (DUBOIS et al., 1956).

- Sulfato

A quantidade de sulfato das frações polissacarídicas foi determinada após uma hidrólise ácida (HCl 4 N, 6 horas, 100° C) e quantificada por turbimetria pelo método da gelatina-bário, tendo-se como padrão o sulfato de sódio (DODGSON; PRICE, 1962).

- Ácido urônico

O conteúdo de ácido urônico foi determinado pela reação de carbazol, utilizando-se ácido D-glucurônico como padrão, sendo as leituras realizadas a 525 nm (DISCHE, 1946).

- Proteína

O grau de contaminação proteica das frações foi determinado com o reagente comassie blue R e a leitura realizada a 595 nm (SPECTOR, 1978).

- Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos foram avaliados quantitativamente pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, utilizando-se como padrão o ácido gálico, sendo as leituras realizadas a 765 nm (ATHUKORALA; KIM; JEON, 2006).

2.3.4.3 Composição monossacarídica

As frações polissacarídicas foram hidrolisadas (HCl 2 N, 2 horas, 100° C) e os monossacarídeos constituintes das frações foram determinados através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando-se a coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 NH₂ (10 µm), tendo como fase móvel acetonitrila:água (80:20) em um fluxo de 1 mL/min a 40° C . Usando-se como padrões de açúcares: galactose, glicose, xilose, manose, fucose, ramnose e arabinose.

2.3.4.4 Massa molecular

A massa molecular dos polissacarídeos sulfatados foi determinada por cromatografia de gel filtração em Sephadex G-100 (140 x 1 cm), usando como eluente NaCl 0,15 M em ácido acético 0,2 M. A eluição foi monitorada pela quantidade de açúcares totais (DUBOIS et al., 1956) e metacromasia (FARNDALE; BUTTLE; BARRETT, 1986). Para a estimativa da massa molecular dos polissacarídeos usou-se dextrans de diferentes massas moleculares como padrão.

2.3.4.5 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho foi realizada em espectrômetro PerkinElmer, de 4.000 a 500 cm⁻¹ no Departamento de Química da Universidade Federal do Rio grande do Norte. Os polissacarídeos sulfatados foram analisados após secagem em aparelho de Abdenhalden, sob forma de pastilha de KBr contendo P₂O₅ a 60° C.

2.3.5 Atividades biológicas das frações polissacarídicas da *C. cupressoides*

2.3.5.1 Atividade antioxidante *in vitro*

- Capacidade Antioxidante Total (CAT)

Esse ensaio baseia-se na redução do Mo^{+6} a Mo^{+5} pela amostra teste (frações polissacarídicas) com subsequente formação de um complexo esverdeado fosfato / molibdênio⁺⁵ em pH ácido. Adicionou-se a amostra teste na solução reagente (0,6 M ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônia). Essa solução foi mantida a 100° C por 90 minutos e depois resfriada a temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se as leituras a 695 nm (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). O resultado foi expresso como mg de ácido ascórbico / g de fração polissacarídica, denominado de equivalentes de ácido ascórbico.

- Quelação férrica

A habilidade de quelar o íon ferro das frações polissacarídicas foi determinada pelo método descrito por Decker e Welch (1990), com modificações de Wang et al. (2008). A ferrozina, reagente utilizado neste ensaio, forma um complexo com o íon Fe^{2+} (coloração rosa). Na presença de agentes quelantes este complexo não é formado, resultando na diminuição da coloração. A redução da coloração permite, assim, estimar a atividade quelante do íon ferro das frações polissacarídicas. A mistura de reação contendo diferentes concentrações das frações polissacarídicas (0,1-2,0 mg/mL), FeCl_2 (0,05 mL, 2 mM) e ferrozina (0,2 mL, 5 mM) foi agitada e incubada por 10 min a temperatura ambiente. A absorbância da solução foi medida a 562 nm. A habilidade, das frações, em quelar o íon ferro foi calculada usando a equação abaixo:

$$\text{Habilidade de quelação (\%)} = ((A_0 - A_1)/A_0) \times 100$$

Onde: A_0 absorbância do controle e A_1 absorbância da amostra teste.

- Sequestro do radical hidroxila (OH^\bullet)

A atividade sequestradora dos radicais hidroxila foi investigada usando a reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$), de acordo com a metodologia descrita por Smirnoff e Cumbes (1989) com pequenas modificações. As frações polissacarídicas em diferentes concentrações (0,1-2 mg/mL) em 3 mL de tampão fosfato (150 mM, pH 7,4) foi incubada com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mM), EDTA (10 mM),

salicilato de sódio (2 mM) e H₂O₂ 30% (250 µL de cada). A solução foi incubada à 37° C por 1 h e a reação detectada por monitoramento da absorbância a 510 nm. No branco o H₂O₂ foi substituído pelo tampão fosfato (SOUZA et al., 2007).

- Sequestro do radical superóxido (O₂^{•-})

Este método baseia-se na capacidade da amostra teste (frações polissacarídicas) em inibir a redução fotoquímica do nitroblue tetrazolium (NBT) em um sistema riboflavina-luz-NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971; DASGUPTA; DE, 2007). 3 mL da solução reagente contendo: tampão fosfato (50 mM, pH 7,8), metionina (13 mM), riboflavina (2 µM), EDTA (100 µM), NBT (75 µM) e 1 mL de solução contendo as frações polissacarídicas em diferentes concentrações (0,1-2 mg/mL), foram incubadas sob iluminação com lâmpada fluorescente por 10 min. A produção do azul de formazan foi monitorada pelo aumento da absorbância a 560 nm.

2.3.5.2 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). O plasma citratado utilizado nestes ensaios foi obtido após a centrifugação de sangue humano retirado de indivíduos adultos, saudáveis e de ambos os sexos. O tempo de coagulação foi determinado utilizando-se um coagulômetro automático da marca Drake.

O PT é realizado adicionando-se ao plasma decalcificado pelo citrato, um excesso de fator tecidual (tromboplastina). O tempo entre a adição do cálcio e a coagulação é chamado de PT. Esse teste consiste na determinação do tempo de coagulação de um plasma citratado, após a adição de FT, também chamado de tromboplastina, e de cálcio à 37° C. A adição de um excesso de tromboplastina promoverá a ativação de todo o fator VII contido na amostra de plasma. O fator VIIa assim, ativará o fator X, iniciando a via comum da coagulação. A tromboplastina é um reagente obtido do cérebro humano, de coelho, de boi ou de macaco. Ele

contém o fator tissular, composto por uma parte protéica e uma parte fosfolipídica que substitui o fator 3 plaquetário, na ativação dos fatores que se ligam a fosfolipídios de membrana (LABTEST, 2009).

O aPTT é o tempo medido entre a adição do cálcio, na presença da cefalina (fator de contato) e a coagulação do plasma. A presença de um fator de contato ativa as reações da via intrínseca da coagulação. O teste consiste na determinação do tempo de coagulação do plasma pobre em plaquetas citratado, após a adição de um ativador da fase de contato da coagulação (por isso é dito ativado), e de um reagente, a cefalina, que substitui o fosfolipídio da membrana plaquetário, uma vez que se trabalha com plasma pobre em plaquetas. O último reagente adicionado é o cálcio, que converte a ação do citrato. O ativador de contato pode ser o caolim, o ácido elágico ou ainda a celite. Este ativador que é colocado em excesso vai ativar o fator XII, na presença da pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular, e o XIIIa vai transformar o fator XI em XIa. O XIa ativa o IX, e este ativo junto com o VIII vão ativar o fator X. A cefalina é um fosfolipídio extraído de cérebro de maneira semelhante à tromboplastina, mas como a diferença que a cefalina não possui atividade de fator tissular, isto é, não é capaz de ativar o fator VII, por isso ela é chamada de tromboplastina parcial (LABTEST, 2009).

2.3.6 Análise estatística

Todos os dados dos experimentos realizados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Para testar diferenças entre frações da CCM e CCB foi utilizado o teste de análise paramétrica de análise de variância (ANOVA). O teste de Student–Newman–Keuls (Nível de significância de $p < 0,05$) foi aplicado para se comprovar algumas similaridades encontradas pela ANOVA.

3 RESULTADOS

3.1 TEMPERATURA E SALINIDADE DA ÁGUA DO MAR

Os pontos de coleta da alga verde *C. cupressoides* foram duas praias do litoral potiguar: a Praia de Camapum (Macau/RN) e a Praia de Búzios (Nísia Floresta/RN). Durante o período de coleta não houve diferença entre a temperatura da água do mar de ambas as praias. Porém, a praia de Camapum teve maior salinidade da água do que a praia de Búzios, como observado na tabela 03.

Tabela 03

Temperatura e salinidade da água do mar das praias de Camapum e Búzios.

| Praia | Temperatura | Salinidade |
|----------------------------|-------------|------------|
| Camapum (Macau/RN) | 28-32° C | 40,0-41,5‰ |
| Búzios (Nísia Floresta/RN) | 28-32° C | 33,5-34,0‰ |

3.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA ALGA *C. cupressoides*

A composição centesimal da alga *C. cupressoides* coletada na praia de Camapum (CCM) e na praia de Búzios (CCB) é mostrada na tabela 04. Não houve variação significativa ($p > 0,05$) na quantidade de proteínas, lipídios, cinzas, fibras e carboidratos entre a CCM e a CCB.

Tabela 04

Composição centesimal da alga *C. cupressoides*.

| Alga | Proteínas (%) | Lipídios (%) | Cinzas (%) | Fibras (%) | Carboidratos (%) |
|------|---------------|--------------|-------------|--------------|------------------|
| CCM | 22,77 ± 0,74 | 4,80 ± 0,57 | 7,82 ± 0,15 | 11,53 ± 0,12 | 54,68 ± 2,31 |
| CCB | 23,47 ± 0,68 | 4,80 ± 0,40 | 6,55 ± 0,16 | 10,25 ± 0,11 | 54,94 ± 1,01 |

CCM: *C. cupressoides* coletada na praia de Camapum; CCB: *C. cupressoides* coletada na praia de Búzios. Não houve diferença significativa entre a CCM e a CCB ($p > 0,05$).

3.3 RENDIMENTO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA *C. cupressoides*

Após o fracionamento com volumes crescentes de acetona obteve-se quatro frações polissacarídicas das algas verdes CCM e CCB, denominadas de F0.3, F0.5, F1.0 e F2.0 de acordo com o volume de acetona acrescentado. Da massa total obtida após a precipitação de todas as frações de cada alga calculou-se o rendimento de cada fração.

O rendimento das frações polissacarídicas da CCM e da CCB é mostrado na figura 07. Não foi observada nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) entre o rendimento das frações da CCM e de suas correlatas na CCB. Além disso, observa-se que a primeira e a última fração, a F0.3 e a F2.0, apresentaram os menores rendimentos percentuais. O melhor rendimento foi apresentado pela F0.5, seguido pela F1.0 para ambas as algas.

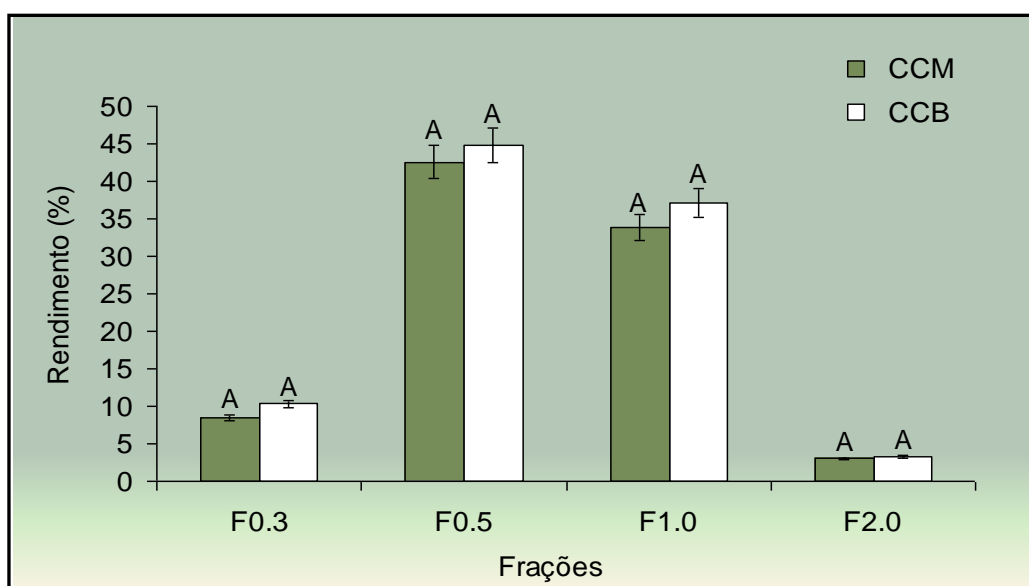


Figura 07: Rendimento percentual das frações polissacarídicas da alga *C. cupressoides* coletada na praia de Camapum (CCM) e na praia de Búzios (CCB) obtidas com o fracionamento com acetona: Após precipitação com acetona PA as frações foram centrifugadas (8.000 g, 15 min, 4° C), secas a pressão reduzida e pesadas. Da massa total obtida após a precipitação de todas as frações da CCM e CCB calculou-se o rendimento de cada uma. ^{A, B} Letras distintas indicam diferenças significativas entre as frações da CCM e suas correlatas na CCB ($p < 0,05$).

3.4 ANÁLISES QUÍMICAS, COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E MASSA MOLECULAR DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA *C. cupressoides*

Os resultados das análises químicas das frações polissacarídicas da CCM e CCB são mostrados na tabela 05. Nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) foi observada na relação sulfato/açúcar entre CCM F1.0 e CCB F1.0 e CCM F2.0 e CCB F2.0. No entanto, houve uma diferença significativa na relação sulfato/açúcar da F0.3 e F0.5 ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) da CCM quando comparadas as suas correlatas na CCB. CCM F0.3 apresentou maior relação sulfato/açúcar do que CCB F0.3, enquanto CCM F0.5 apresentou uma menor relação sulfato/açúcar que sua correspondente na CCB.

Além disso, foi observada a ausência de ácidos urônicos e de contaminação por proteínas em todas as frações polissacarídicas; e uma baixa contaminação por compostos fenólicos nas frações (tabela 05).

A massa molecular dos polissacarídeos sulfatados foi determinada por cromatografia de gel filtração em Sephadex G-100. Para ambas CCM e CCB, os polissacarídeos sulfatados da F0.3, F0.5, F1.0 e F2.0 apresentaram uma massa molecular de 143, 135, 147 e 145 KDa, respectivamente (tabela 05).

Tabela 05

Composição química e massa molecular das frações polissacarídicas da alga *C. cupressoides*.

| Fração | Sulfato/açúcar ^a | Ácido Urônico (%) ^b | Proteínas (%) ^b | Fenólicos totais (%) ^b | Massa molecular (KDa) ^c |
|----------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| CCM F0.3 | 0,80 ± 0,01 ^A | - | - | 0,45 ± 0,09 | ~ 143 |
| CCB F0.3 | 0,63 ± 0,02 ^B | - | - | 0,49 ± 0,02 | ~ 143 |
| CCM F0.5 | 0,48 ± 0,04 ^A | - | - | 0,44 ± 0,01 | ~ 135 |
| CCB F0.5 | 0,73 ± 0,24 ^B | - | - | 0,34 ± 0,01 | ~ 135 |
| CCM F1.0 | 0,23 ± 0,01 | - | - | 0,36 ± 0,03 | ~ 147 |
| CCB F1.0 | 0,23 ± 0,01 | - | - | 0,30 ± 0,03 | ~ 147 |
| CCM F2.0 | 0,44 ± 0,04 | - | - | 0,62 ± 0,00 | ~ 145 |
| CCB F2.0 | 0,53 ± 0,02 | - | - | 0,78 ± 0,05 | ~ 145 |

^a O total de açúcares e sulfato das frações polissacarídicas foi determinado pelos métodos de fenol/H₂SO₄ e gelatina/BaCl₂, respectivamente.

^b A percentagem de ácidos urônicos, proteínas e fenólicos totais, foram determinadas pela reação de carbazol, pelo reagente comassie blue R e pelo método de Folin-Ciocalteau, respectivamente.

^c A massa molecular média (KDa) foi estimada por cromatografia de gel filtração em Sephadex G-100. – não detectado até a massa de 750 µg de fração.

^{A, B} Letras distintas indicam diferença significativa entre as frações da CCM e suas correlatas na CCB (p<0,05 para F0.3 e p<0,01 para F0.5).

A composição monossacarídica dos polissacarídeos sulfatados da CCM e CCB foi examinada por HPLC. A tabela 06 mostra que a razão molar destes componentes não está relacionada com a salinidade da água do mar. CCM F0.3 e CCB F0.3 são compostas de galactose e pequenas quantidades de glicose, manose e xilose. As F0.5 contém galactose, manose e traços de xilose e as F1.0 contém galactose, manose, xilose e traços de glicose e ramnose. Já a F2.0 (tanto da CCM como da CCB) é bastante heterogênea em termos de composição monossacarídica quando comparada as outras frações, sendo constituída por seis monossacarídeos.

Tabela 06

Relação molar dos monossacarídeos das frações polissacarídicas da CCM e CCB.

| Fração | Composição monossacarídica (razão molar) ^a | | | | | |
|----------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Gal | Gli | Man | Xil | Ram | Fuc |
| CCM F0.3 | 1,0 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | - | - |
| CCB F0.3 | 1,0 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | - | - |
| CCM F0.5 | 1,0 | - | 0,1 | tr | - | - |
| CCB F0.5 | 1,0 | - | 0,1 | tr | - | - |
| CCM F1.0 | 1,0 | tr | 0,1 | 0,7 | tr | - |
| CCB F1.0 | 1,0 | tr | 0,1 | 0,6 | tr | - |
| CCM F2.0 | 1,0 | 0,6 | 1,7 | 0,9 | 0,4 | 1,0 |
| CCB F2.0 | 1,0 | 0,6 | 1,8 | 1,0 | 0,5 | 1,0 |

^aA composição monossacarídica foi estimada por HPLC. Gal: Galactose; Gli: Glicose; Man: Manose; Xil: Xilose; Ram: Ramnose; Fuc: Fucose; -: não detectado; tr: traços.

3.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA *C. cupressoides*

A mobilidade eletroforética dos polissacarídeos sulfatados em gel de agarose, usando tampão PDA 0,05 M pH 9,0 é mostrada na figura 08. O perfil eletroforético das frações foi observado após coloração da lâmina com azul de toluidina e descoloração. Os compostos ricos em sulfato interagem com o azul de toluidina e desenvolvem uma coloração violácea, dessa forma, verificou-se a presença de polissacarídeos sulfatados em todas as frações da CCM e da CCB, como visualizado na figura 08.

A alga *C. cupressoides* sintetiza, principalmente, quatro tipos de populações de polissacarídeos sulfatados, as quais foram separadas uma da outra por precipitação com acetona. Polissacarídeos com baixa mobilidade foram encontrados na fração F0.3, enquanto F0.5 e F1.0 contém polissacarídeos com mobilidades intermediária e alta, respectivamente. Nas F2.0 observa-se uma banda com

coloração muito clara, isso pode ser devido a conformação do polissacarídeo que não permite que os grupos sulfatos fiquem expostos para interagir com o azul de toluidina e assim apresentarem uma coloração mais forte, como vista nas outras frações.

Observou-se também que o perfil eletroforético dos polissacarídeos sulfatados da CCM é similar aos de seus correlatos extraídos da CCB.

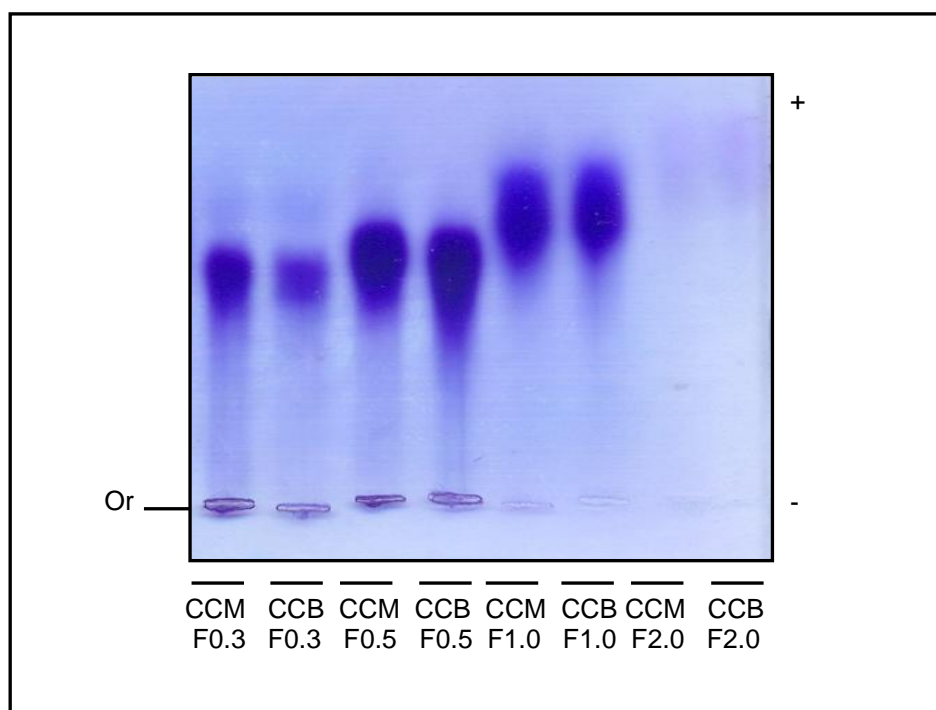


Figura 08: Comportamento eletroforético das frações polissacarídicas da *C. cupressoides* resultantes do fracionamento com acetona. Alíquotas de 5 μ l (50 μ g) das frações provenientes do fracionamento com acetona foram aplicados em lâminas de agarose em tampão PDA 0,05 M pH 9,0. Após precipitação com CETAVLON as lâminas foram coradas com azul de toluidina. Or - origem. – Polo negativo. + Polo positivo.

3.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA *C. cupressoides*

A espectroscopia de infravermelho vem sendo utilizada como uma poderosa ferramenta para demonstrar similaridades entre compostos. A figura 09 mostra os espectros dos polissacarídeos sulfatados da CCM e da CCB. Foram observados sinais indicativos de grupos sulfatos: 1380-1355 cm^{-1} (para as F1.0), 1261-1259 cm^{-1} (para as F0.3, F0.5 e F1.0), 1250-1230 cm^{-1} (para a F2.0), 1026 cm^{-1} (para as F0.3 e

F0.5), 847 cm^{-1} (para F1.0), 617 cm^{-1} (para a F2.0) e 580 cm^{-1} (para as F0.3, F0.5 e F1.0). Isto confirma a presença de polissacarídeos sulfatados nas frações da CCM e CCB. Além disso, observaram-se sinais na região de 3400-3000 cm^{-1} e 2920 cm^{-1} , característico de deslocamento de grupos OH e C-H, respectivamente, em todas as frações. Observa-se, ainda, que os espectros das frações da CCM são similares aos de suas correspondentes na CCB.

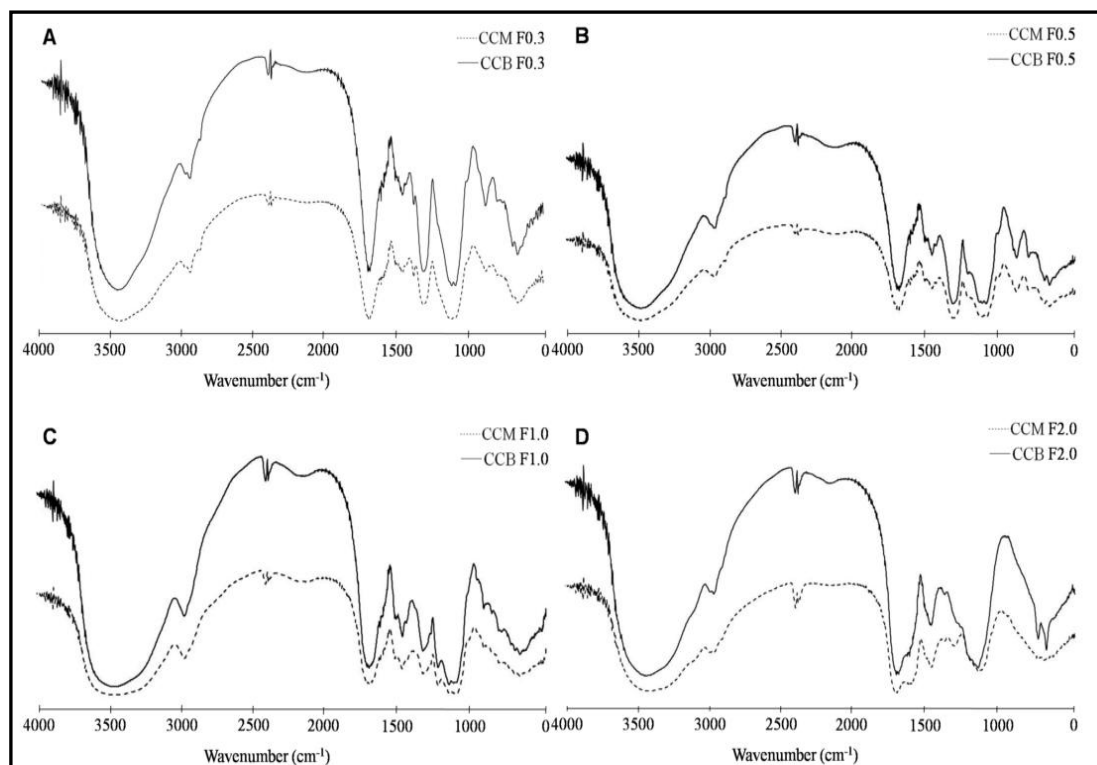


Figura 09: Espectroscopia de infravermelho das frações polissacarídicas da alga *C. cupressoides*. (A) espectros da CCM F0.3 e CCB F0.3; (B) espectros da CCM F0.5 e CCB F0.5; (C) espectros da CCM F1.0 e CCB F1.0; (D) espectros da CCM F2.0 e CCB F2.0. (---) CCM e (—) CCB.

3.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS DA ALGA *C. cupressoides*

A influência da salinidade em duas atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados de *C. cupressoides* foi investigada: atividade antioxidante, a qual é interessante pelo potencial uso de polissacarídeos sulfatados; e atividade anticoagulante, atividade bem estudada de polissacarídeos sulfatados em geral. Infelizmente, a F2.0 não foi utilizada nestes testes, devido ao seu baixo rendimento.

3.7.1 Atividade antioxidante *in vitro* das frações polissacarídicas da alga *C. cupressoides*

A atividade antioxidante *in vitro* de frações polissacarídicas da CCM e da CCB foi avaliada por diferentes ensaios: capacidade antioxidante total (CAT), quelação férrica, sequestro do radical hidroxila e sequestro do radical superóxido.

Todas as frações polissacarídicas apresentaram CAT, como demonstrado na figura 10. No entanto, apenas CCM F0.3 e CCB F0.3 mostraram diferença significativa entre si ($p < 0,05$). CCM F0.3 foi mais potente que CCB F0.3, com 31,7 e 20,7 equivalentes de ácido ascórbico, respectivamente.

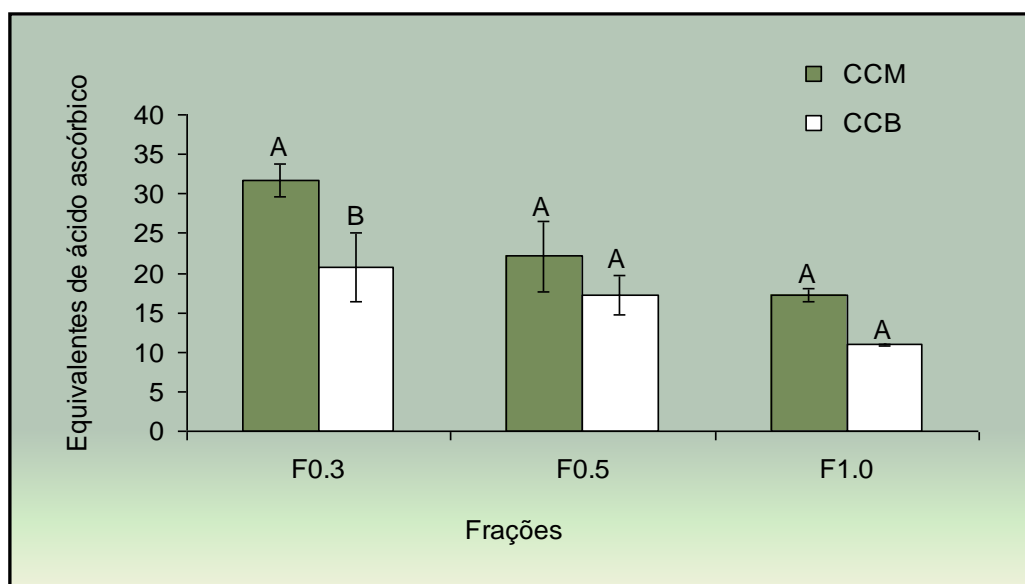


Figura 10: Capacidade antioxidante total das frações polissacarídicas da alga *C. cupressoides* coletada na praia de Camapum (CCM) e na praia de Búzios (CCB). Os resultados são expressos como equivalentes de ácido ascórbico. Os valores são expressos como a média \pm desvio padrão ($n=3$). ^{A, B} Letras distintas indicam diferenças significativas entre as frações da CCM e suas correlatas na CCB ($p < 0,05$).

A figura 11 mostra a atividade de quelação férrica das frações polissacarídicas da CCM e da CCB. Todas as frações apresentaram capacidade de quelação do íon ferro. Diferente do resultado obtido para o ensaio de CAT, F0.5 foi a única fração a apresentar diferença significativa entre suas correspondentes da CCM e CCB ($p < 0,01$ para a concentração de 0,5 mg/mL e $p < 0,001$ para as demais concentrações). Na concentração de 2,0 mg/mL, CCM F0.5 foi 1,8 vezes mais potente que sua correlata na CCB.

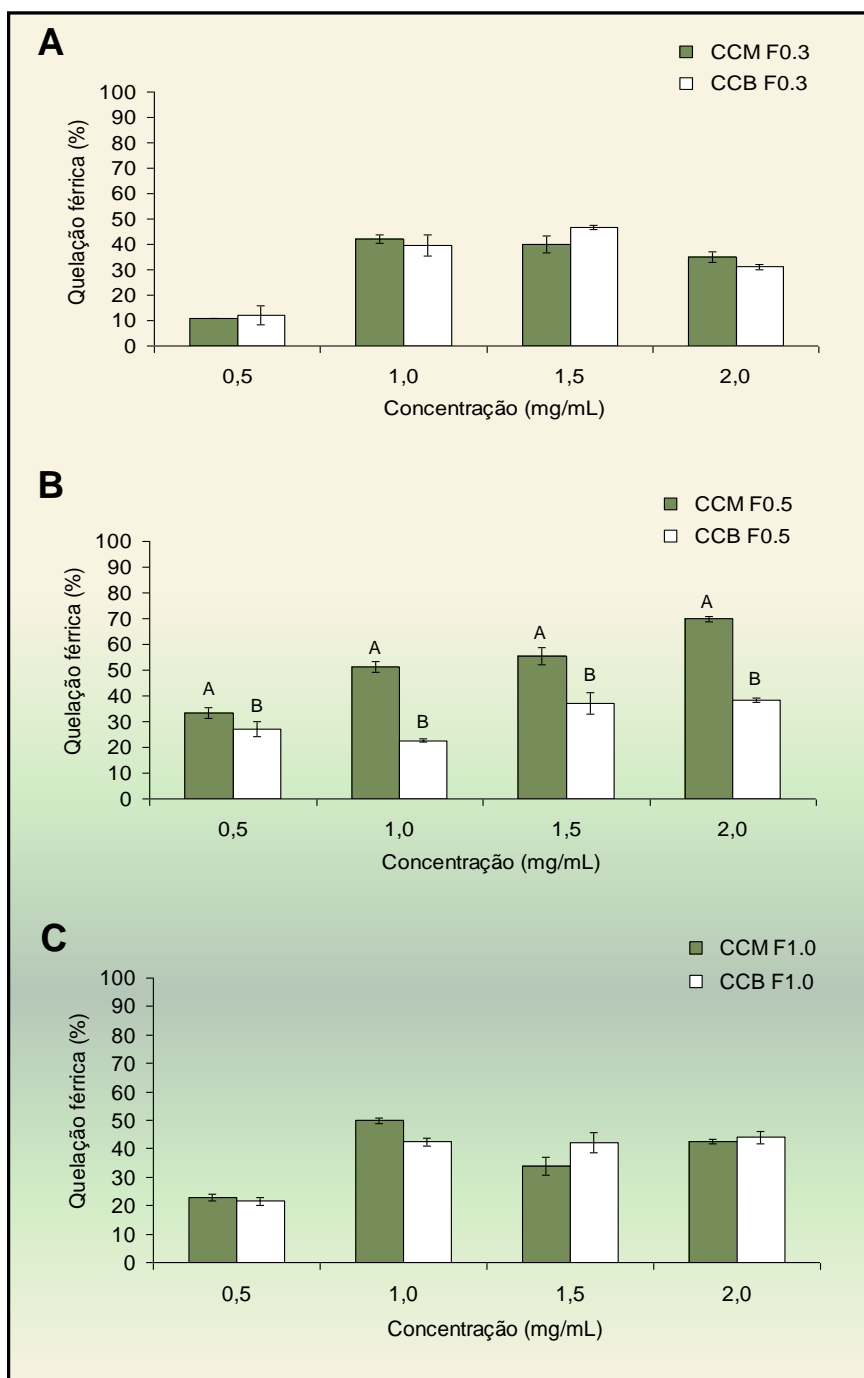


Figura 11: Quelação férrica das frações polissacarídicas da alga *C. cupressoides* coletada na praia de Camapum (CCM) e na praia de Búzios (CCB). (A) quelação férrica das CCM F0.3 e CCB F0.3; (B) quelação férrica das CCM F0.5 e CCB F0.5; (C) quelação férrica das CCM F1.0 e CCB F1.0. Os valores são expressos como a média \pm desvio padrão ($n=3$). ^{A, B} Letras distintas indicam diferenças significativas entre as frações da CCM e suas correlatas na CCB ($p<0,01$ para 0,5 mg/mL e $p<0,001$ para as demais concentrações).

A capacidade das frações polissacarídicas da alga *C. cupressoides* em sequestrar os radicais hidroxila e superóxido foi avaliada como descrito em métodos. Porém, as frações da CCM e CCB não apresentaram atividade antioxidante pelo mecanismo de sequestro de radicais hidroxilas, nem radicais superóxido até uma concentração de 2 mg/mL.

3.7.2 Atividade anticoagulante das frações polissacarídicas da alga *C. cupressoides*

A atividade anticoagulante das frações polissacarídicas da CCM e da CCB está sumarizada nas tabelas 07 e 08. No teste de aPTT, o qual avalia a via intrínseca da coagulação, todas as frações apresentaram atividade anticoagulante de maneira dose-dependente (tabela 07). F0.3 e F0.5 não mostram diferença significativa ($p > 0,05$) entre CCM e suas correspondentes em CCB; enquanto, CCB F1.0 foi mais potente ($p < 0,001$) que CCM F1.0 em todas as concentrações testadas. Além disso, as atividades no teste de aPTT das frações F0.3 e F0.5 foram similares a clexane[®], heparina de baixo peso molecular, nas mesmas concentrações (de 1,5 a 16,5 $\mu\text{g/mL}$).

No teste de PT, o qual avalia a via extrínseca da coagulação, apenas F0.3 e F0.5 apresentaram atividade anticoagulante. Além disso, houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre a atividade da CCM F0.5 e sua correlata na CCB (tabela 08).

Tabela 07

Atividade anticoagulante no teste de aPTT das frações polissacarídicas isoladas da *C. cupressoides*^a.

| | aPTT (s) ^b | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------|------------|-------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Concentração (µg/mL) | | | | | | |
| | 1,5 | 3,0 | 8,0 | 16,5 | 33,0 | 66,5 | 100,0 |
| Clexane ^{®c} | 47,8 ± 2,6 | 65,2 ± 1,7 | 168,0 ± 7,3 | > 240 | nd ^d | nd | nd |
| CCM F0.3 | 55,6 ± 1,8 | 63,6 ± 3,7 | 163,1 ± 3,4 | 180,7 ± 1,5 | nd | nd | nd |
| CCB F0.3 | 66,7 ± 0,6 | 58,2 ± 1,1 | 160,9 ± 1,9 | 183,1 ± 0,1 | nd | nd | nd |
| CCM F0.5 | 52,0 ± 1,6 | 86,6 ± 1,6 | 184,5 ± 1,9 | > 240 | nd | nd | nd |
| CCB F0.5 | 56,8 ± 3,3 | 72,3 ± 0,9 | 206,7 ± 6,1 | > 240 | nd | nd | nd |
| CCM F1.0 | 30,0 ± 0,3 | 31,2 ± 0,1 | 38,2 ± 0,6 | 43,3 ± 0,4 ^A | 86,0 ± 1,4 ^A | 136,6 ± 3,3 ^A | 181,7 ± 2,3 ^A |
| CCB F1.0 | 31,1 ± 0,2 | 31,0 ± 0,6 | 42,6 ± 0,2 | 79,5 ± 2,1 ^B | 173,4 ± 3,5 ^B | > 240 ^B | > 240 ^B |

^a Os dados são expressos como a média ± desvio padrão.

^b aPTT: tempo de tromboplastina parcial ativada. Tempo de coagulação do controle 30 ± 3,3 s.

^c Clexane[®]: heparina de baixo peso molecular.

^d nd: não determinado.

^{A, B} Letras distintas indicam diferença significativa entre as frações da CCM e suas correlatas na CCB na mesma concentração (p<0,001).

Tabela 08

Atividade anticoagulante no teste de PT das frações polissacarídicas isoladas da *C. cupressoides*^a.

| | PT (s) ^b | | | | |
|-----------------------|----------------------|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Concentração (µg/mL) | | | | |
| | 16,5 | 33,0 | 66,5 | 100,0 | 133,0 |
| Heparina ^c | >120 | >120 | >120 | >120 | >120 |
| CCM F0.3 | 12,7 ± 0,1 | 13,6 ± 0,1 | 18,4 ± 0,6 | 24,7 ± 0,9 | 26,4 ± 0,2 |
| CCB F0.3 | 13,8 ± 0,7 | 15,9 ± 0,5 | 21,5 ± 2,1 | 27,5 ± 1,7 | 29,9 ± 1,9 |
| CCM F0.5 | 13,1 ± 0,2 | 17,2 ± 2,6 | 23,1 ± 0,6 ^A | 32,3 ± 0,5 ^A | 31,8 ± 0,4 ^A |
| CCB F0.5 | 14,8 ± 0,0 | 18,6 ± 1,0 | 31,7 ± 0,9 ^B | 45,5 ± 0,5 ^B | 59,2 ± 1,5 ^B |
| CCM F1.0 | 12,8 ± 0,2 | 13,0 ± 0,0 | 13,3 ± 0,2 | 13,5 ± 0,1 | 13,6 ± 0,0 |
| CCB F1.0 | 12,6 ± 0,2 | 13,0 ± 0,0 | 13,6 ± 0,3 | 13,7 ± 0,1 | 14,0 ± 0,0 |

^a Os dados são expressos como a média ± desvio padrão.

^b PT: Tempo de protrombina. Tempo de coagulação do controle 13,2 ± 0,2 s.

^c Heparina: heparina não fracionada.

^{A, B} Letras distintas indicam diferença significativa entre as frações da CCM e suas correlatas na CCB na mesma concentração (p<0,001).

4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos a composição centesimal de certas espécies de algas vermelhas e marrons vem sendo analisada e se tem observado que há correlações entre a composição e parâmetros abióticos. Dentre estes estudos, alguns demonstram que o conteúdo de carboidratos de algas é influenciado positivamente pela salinidade da água do mar (PERFETO, 1998; MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2006). Por isso, inicialmente, investigou-se nesse trabalho, se a composição centesimal, principalmente o conteúdo de carboidratos, da *C. cupressoides* seria também influenciada pela salinidade.

A composição centesimal (proteínas, lipídios, cinzas, fibras e carboidratos) de ambas CCM e CCB não variou em função da salinidade do habitat. Estes dados diferem daqueles obtidos por Perfeto (1998) que observou que a quantidade de carboidratos das algas vermelhas *Grateloupia doryphora* e *Gymnogongrus griffithsiae* tinha uma correlação positiva com a salinidade da água do mar, ou seja, quanto maior a salinidade da água do mar, maior a quantidade de carboidratos presentes na alga. Mais recentemente, um trabalho com duas espécies de algas (*Gracilaria cervicornis* e *Sargassum vulgare*) coletadas também na praia de Búzios durante um ano, período no qual a salinidade oscilou entre 30‰ e 41‰, mostrou dado semelhante ao de Perfeto (1998), ou seja, a salinidade estimula o aumento na quantidade de carboidratos nestas algas (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2006). Esse padrão também foi observado para a alga vermelha *Catenella repens* da costa da Índia, a qual também apresentou uma correlação positiva entre o conteúdo de carboidratos e salinidade (BANERJEE et al., 2009).

Não foram encontrados estudos com algas verdes que correlacionassem a salinidade do mar com alterações da composição centesimal das mesmas. Portanto, não se pode chegar a uma conclusão definitiva. Porém, algumas hipóteses podem ser levantadas: as algas verdes seriam mais resistentes a salinidade e por isso não sofririam influência deste fator. A espécie *C. cupressoides* seria mais resistente a salinidade. Ou, não é uma questão de resistência, mas sim, do fato que cada alga responderia ao aumento da salinidade de modo diferente.

Um ponto a favor desta última hipótese é o fato de que o trabalho de Paiva

(1984) que estudou a influencia da sazonalidade na composição de quatro espécies de Rhodophyta (*C. crenulata*, *G. domingensis*, *S. tenara* e *H. musciformes*) e uma de Phaeophyta (*S. vulgare*) ter demonstrado que os componentes dessas algas variavam de acordo com a sazonalidade, por exemplo, o conteúdo de carboidratos de *C. crenulata* aumentou de julho para novembro, já para as demais algas houve um decréscimo desse componente neste período (PAIVA, 1984). O autor concluiu que cada alga responderia a sazonalidade de forma diferente.

Um resultado interessante foi à quantidade de proteínas da *C. cupressoides* em comparação com a maioria das espécies de algas habitualmente consumidas como alimento (tabela 09). Apesar de ainda não haver relatos de que a *C. cupressoides* seja comestível, ela contém níveis relativamente maiores dessas moléculas que as algas verdes comestíveis *Ulva lactuca*, *Caulerpa lentillifera*, (FLEURENCE, 1999; WONG; CHEUNG, 2000; RATANA-ARPORN; CHIRAPART, 2006) e as marrons *Laminaria digitata*, *Fucus sp.*, *Ascophyllum nodosum* (FLEURENCE, 1999); e similar a *Ulva reticulada* e a *Ulva pertusa* (FLEURENCE, 1999; RATANA-ARPORN; CHIRAPART, 2006). Porém, ensaios biológicos necessitam ser realizados a fim de se verificar se o conteúdo protéico da alga é de boa qualidade, bem como se verificar o grau de digestibilidade desta alga, o que contribuirá para o seu uso na indústria alimentícia.

Um estudo com um grupo específico de carboidratos, polissacarídeos sulfatados de invertebrados (GAG's), demonstrou que a concentração desses polissacarídeos, em invertebrados marinhos, aumentava com o aumento da salinidade do habitat (NADER et al., 1983). Apesar da salinidade não influenciar na quantidade de carboidratos totais da *C. cupressoides*, resolveu-se investigar se esse parâmetro abiótico influenciaria na quantidade de polissacarídeos sulfatados desta alga.

Quando se comparou o rendimento das frações polissacarídicas não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre as frações extraídas da CCM e CCB. O que demonstrou que diferente de polissacarídeos sulfatados de animais descritos por Nader et al. (1983), a salinidade não influencia no metabolismo (síntese e/ou degradação) de polissacarídeos sulfatados da *C. cupressoides*.

Tabela 09

Composição centesimal da alga *C. cupressoides* e de algumas algas marinhas comestíveis.

| Alga | Proteínas (%) | Lipídios (%) | Cinzas (%) | Fibras (%) | Carboidratos (%) | |
|-------------|-------------------------------------|--------------|------------|------------|------------------|-------|
| Rhodophyta | <i>G. cervicornis</i> ^a | 22,96 | 0,43 | 7,72 | 5,65 | 63,12 |
| | <i>G. cornea</i> ^b | 5,47 | nd | 29,60 | 5,21 | 36,29 |
| Phaeophyta | <i>A. nodosum</i> ^c | 3-15 | nd | nd | nd | nd |
| | <i>L. digitata</i> ^c | 8-15 | nd | nd | nd | nd |
| | <i>S. vulgare</i> ^a | 15,76 | 0,45 | 14,20 | 7,73 | 67,80 |
| Chlorophyta | <i>C. lentillifera</i> ^d | 12,49 | 0,86 | 24,21 | 3,17 | 59,27 |
| | <i>C. recemosa</i> ^b | 3,98 | nd | 55,11 | 1,36 | 3,60 |
| | <i>U. lactuta</i> ^e | 7,06 | 1,64 | 21,3 | 55,4 | 14,60 |
| | <i>U. pertusa</i> ^c | 20-26 | nd | nd | nd | nd |
| | <i>U. reticulada</i> ^d | 21,06 | 0,75 | 17,58 | 4,84 | 55,77 |
| | <i>U. rígida</i> ^f | 6,40 | 0,30 | 52,00 | nd | 18,10 |
| | CCM | 22,77 | 4,80 | 7,82 | 11,53 | 54,68 |
| | CCB | 23,47 | 4,80 | 6,55 | 10,25 | 54,94 |

CCM: *C. cupressoides* coletada na praia de Camapum; CCB: *C. cupressoides* coletada na praia de Búzios; nd: não determinado. ^aMARINHO-SORIANO et al., 2006. ^bROBLEDO; FREILE-PELEGRIN, 1997. ^cFLEURENCE, 1999. ^dRATANA-ARPORN; CHIRAPART, 2006. ^eWONG; CHEUNG, 2000. ^fFOSTER et al., 1998.

A obtenção dessas frações se deu pela utilização de uma metodologia simples e pouco onerosa desenvolvida pelo grupo de pesquisa do BIOPOL, pela qual se pode separar diferentes populações de polissacarídeos sulfatados de acordo com a interação destes com solventes polares (ROCHA, 1998), conseguiu-se extrair e fracionar polissacarídeos sulfatados da *C. cupressoides*. Após o fracionamento com volumes crescentes de acetona obteve-se quatro frações polissacarídicas, denominadas de F0.3, F0.5, F1.0 e F2.0, tanto para CCM como para CCB.

Do material extraído da alga *C. cupressoides*, os menores rendimentos percentuais foram obtidos nas frações F0.3 e F2.0, já as frações intermediárias, a

F0.5 e a F1.0, apresentaram os maiores rendimentos. Este rendimento obtido se assemelha ao de outros trabalhos desenvolvidos pelo grupo do BIOPOL com algas verdes, como a *Caulerpa prolifera* e a *Codium isthmocladum*, nestes as frações intermediárias apresentaram maior rendimento do que a primeira e a última fração polissacarídica (FARIAS, 2005; FARIAS et al., 2008), isto também já foi observado para as algas marrons *Dictyota menstrualis* (ALBUQUERQUE, 2005) e *Padina gymnospora* (MARQUES, 2007).

A salinidade não influenciou no metabolismo de carboidratos da alga *C. cupressoides* (carboidratos totais, nem polissacarídeos sulfatados). Contudo, estudos que relacionam a composição química dos polissacarídeos de algas marinhas e a sazonalidade, demonstraram que a composição química dessas moléculas pode ou não variar com a sazonalidade, dependendo da espécie estudada (HONYA et al, 1999; RIOUX; TURGEON; BEAULIEU, 2009; GRUNEWALD; GROTH; ALBAN, 2009). Por isso, resolveu-se investigar se a salinidade da água do mar influenciaria a composição química das frações de polissacarídeos sulfatados da alga *C. cupressoides*.

As frações polissacarídicas F0.3 e F0.5 da CCM mostraram uma diferença significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) na razão sulfato/açúcar em comparação com as suas correspondentes em CCB (CCM 0.3 e CCB 0.5 tiveram maior razão/sulfato que suas correlatas), enquanto a razão sulfato/açúcar de F1.0 e F2.0 não foi afetada significativamente ($p > 0,05$) pela salinidade. Os polissacarídeos sulfatados de algas, encontrados, principalmente, na matriz extracelular, têm uma função osmótica, selecionando as moléculas que entram nas células e também função na manutenção do equilíbrio de íons entre o citoplasma e o meio ambiente (KLOAREG; QUATRANO, 1988). Uma função semelhante foi descrita para polissacarídeos sulfatados de angiospermas marinhas. Nestas plantas os polissacarídeos sulfatados estão mais concentrados nas regiões mais externas da planta, regiões que estão em contato com o meio ambiente, do que nas regiões internas da planta, especialmente na raiz (AQUINO et al., 2005). A F0.3 foi afetada positivamente pela mudança na salinidade, isso pode sugerir que F0.3 está localizada, principalmente, na parte externa da *C. cupressoides*, sendo responsável pela absorção de nutrientes da água do mar e, conseqüentemente, mais vulnerável

ao gradiente de salinidade. No entanto, não foi possível explicar porque CCB F0.5 se mostrou mais sulfatada do que CCM F0.5. Alguns trabalhos mostram a produção de anticorpos contra polissacarídeos como fucanas (EARDLEY et al., 1990), arabinoxilanas (GUILLON et al., 2004), dermatam sulfato (LENSEN et al., 2006) e a utilização destes para se identificar a localização destes polissacarídeos em tecidos. Portanto, futuramente, pretende-se produzir anticorpos contra F0.5 e utilizá-los como ferramentas para identificar sua localização na alga, e assim entender a sua função na alga. Em síntese, estes resultados sugerem que a diferença observada na razão sulfato/açúcar entre os polissacarídeos sulfatados da alga *C. cupressoides* não é meramente função da salinidade, mas, provavelmente, também está relacionada com a função biológica destes biopolímeros na alga.

Não foi detectado contaminação protéica nas frações polissacarídicas da *C. cupressoides* e observou-se uma baixa contaminação por compostos fenólicos totais. Este fato não foi surpreendente, pois valores baixos desses contaminantes foram encontrados em frações polissacarídicas obtidas pela mesma metodologia de extração do presente trabalho (ALBUQUERQUE, et al., 2004; FARIAS, 2005; SILVA et al., 2005), isto indica a eficiência na metodologia de extração de polissacarídicas sulfatados utilizada pelo grupo de pesquisa do BIOPOL.

Como mostrado nas tabelas 05 e 06 nem a massa molecular, nem a composição monossacarídica dos polissacarídeos sulfatados foram afetadas pela salinidade da água do mar. A análise da composição monossacarídica das frações polissacarídicas extraídas da *C. cupressoides* demonstrou que a mesma tem uma composição monossacarídica heterogênea, sendo a galactose o principal componente na maioria delas. Essa heterogeneidade de monossacarídeos também é observada para polissacarídeos sulfatados de outras espécies de Chlorophyta como a *Ulva conglobata* (MAO et al., 2006); e inclusive para espécies de Caulerpa como a *C. okamurai* (HAYAKAWA et al., 2000) e *C. racemosa* (GHOSH et al., 2004). No entanto, homopolímeros já foram obtidos, como arabinanas e galactanas, de espécies *Codium* (FARIAS et al, 2008; ESTEVEZ et al, 2009). Há uma predominância de um monossacarídeo em detrimento de outros monossacarídeos em certas famílias de algas. Por exemplo, os polissacarídeos de algas de Codiaceae são compostos, principalmente, de arabinose e galactose, os da Caulerpaceae,

como *C. cupressoides*, são compostos, principalmente, de galactose, já os de Ulvaceae, apresentam a ramnose como principal monossacarídeo (HAYAKAWA et al, 2000, MAO et al, 2006). No entanto, as evidências existentes são insuficientes para estabelecer uma relação sistemática entre a estrutura, incluindo a composição monossacarídica, e a filogenia das algas.

A espectroscopia de infravermelho demonstrou que as frações polissacarídicas da CCM são semelhantes aos de suas correspondentes da CCB, indicando que as principais características estruturais dos polissacarídeos de *C. cupressoides*, mesmo aqueles da F0.3 e F0.5, não foram afetados pela salinidade da água do mar.

C. cupressoides teve seus polissacarídeos sulfatados separados em 4 populações com mobilidades diferentes em eletroforese em gel agarose no sistema PDA (figura 08). Além disso, as frações de CCM apresentaram mobilidades aproximadas as suas correlatas em CCB. Neste sistema, a diamina interage com os polissacarídeos de acordo com o espaçamento entre as cargas negativas existentes no polímero (DIETRICH; DIETRICH, 1976). Assim, polissacarídeos sulfatados estruturalmente semelhantes assumem conformações semelhantes, formam complexos semelhantes com a diamina e assim possuem mobilidade eletroforética semelhante. Portanto, os dados de eletroforese confirmaram aqueles visto com infravermelho, ou seja, as frações da CCM são muito semelhantes estruturalmente as suas correlatas na CCB.

A F2.0 apesar de apresentar sulfato em sua estrutura não se corou com a mesma intensidade que as outras frações. Isto pode ser devido à conformação do polissacarídeo que não permite que os grupos sulfatos fiquem expostos a ponto de interagir com o azul de toluidina e assim este não apresentaria uma coloração característica.

Levando em consideração que o extrato rico em polissacarídeos de *C. cupressoides* exibiu atividade anticoagulante e antioxidante (COSTA et al., 2010) e que estudos prévios demonstraram que a sazonalidade pode interferir nas atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas (GRÜNEWALD; GROTH; ALBAN, 2009) decidiu-se avaliar o efeito da salinidade sobre as atividades biológicas das frações polissacarídicas da CCM e CCB. A CCM F2.0 e a CCB F2.0 apresentaram

rendimentos muito baixos (figura 07), por isso, suas atividades farmacológicas não foram investigadas.

A formação exacerbada de ERO pode promover sérios danos às biomoléculas. Para combater as espécies reativas formadas, os organismos dispõem de defesas que neutralizam a presença de ERO (enzimas antioxidantes e moléculas envolvidas no sequestro das ERO) e que previnem a formação de ERO (enzimas antioxidantes e compostos quelantes de íons metais) (SOMOGYI et al., 2007). Nos últimos anos, polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vêm sendo descritos como possuidores de atividade antioxidante, tanto pelo mecanismo de sequestro de radicais livres, como pela quelação de íons metais (RUPÉREZ; AHRAZEM; LEAL, 2002; ZHANG et al., 2003; SOUZA et al., 2007; WANG et al., 2008).

No ensaio de capacidade antioxidante total, todas as frações polissacarídicas da CCM e da CCB foram capazes de reduzir Mo (VI), formando um complexo esverdeado fosfato/Mo (V). No entanto, apenas F0.3 mostrou uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre a CCM e a CCB. A fração mais sulfatada (CCM F0.3) foi mais potente que a CCB F0.3. Dados semelhantes foram encontrados com outros polissacarídeos sulfatados de algas, que também aumentaram sua atividade antioxidante de acordo com o aumento da sulfatação do polímero (QI et al., 2005a; WANG et al., 2008). Por outro lado, CCB F0.5 (fração mais sulfatada) não apresentou atividade mais potente do que a CCM F0.5.

O papel dos metais, principalmente o ferro, na formação das ERO é confirmado pela reação de Fenton, na qual o ferro no estado ferroso (Fe^{2+}) reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando o mais reativo dos radicais livres, o radical hidroxila (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O ferro férrico (Fe^{3+}) também pode produzir radicais livres mais numa taxa dez vezes menor do que o ferro ferroso (QI et al., 2006). A atividade quelante de metal de uma molécula antioxidante impede a formação de ERO e conseqüentemente o dano oxidativo (KUMAR; GANESAN; RAO, 2008). A figura 11 mostra que todas as frações da alga *C. cupressoides* exibiram capacidade quelante de íons ferro. CCM F0.5 apresentou uma excelente capacidade quelante de íons ferro, com 69,9% de quelação na concentração de 2,0 mg/mL. Atividade quelante de íons ferro desta fração é

bastante superior aquelas atividades encontradas na literatura para polissacarídeos sulfatados naturais de algas marinhas (QI et al., 2005a; QI et al., 2006; WANG et al., 2008) e similar a observada para uma fração polissacarídica da alga vermelha *G. caudata* (COSTA et al., 2008). Além disso, houve uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre a atividade da CCM F0.5 (baixo teor de sulfato) e da CCB F0.5 (alto teor de sulfato). Na concentração de 2,0 mg/mL a capacidade quelante da CCM F0.5 foi 1,8 vezes maior do que a de sua correlata na CCB.

Estes dados indicam que a capacidade antioxidante total e a atividade quelante de íons ferro dos polissacarídeos sulfatados da CCM e da CCB dependem do padrão de distribuição espacial dos grupos sulfato, em vez de ser meramente função da quantidade de sulfato (grau de sulfatação).

O radical superóxido é um oxidante relativamente fraco, no entanto, ele pode ser decomposto em formas mais reativas, como os radicais hidroxilas (QI et al., 2005b). Um dos mecanismos antioxidantes contra esses radicais é promover o sequestro dos mesmos evitando, assim, os danos ao organismo que o excesso desses radicais livres possa causar (SOMOGYI et al., 2007). As frações polissacarídicas da alga *C. cupressoides* foram submetidas aos ensaios de sequestro de radicais superóxido e hidroxila, no entanto, nenhuma fração apresentou atividade antioxidante por esse mecanismo. Em se tratando de algas verdes foi visto apenas atividade sequestradora desses radicais para os polissacarídeos sulfatados da alga *Ulva pertusa*, sendo os resultados mais relevantes os obtidos pelos polissacarídeos modificados artificialmente (QI et al., 2005a; QI et al., 2006), já polissacarídeos sulfatados da alga marrom *Laminaria japonica* apresentaram 90% de sequestro de radicais superóxido em uma concentração de 75 µg/mL, atividade muito mais elevada que a da vitamina C (WANG et al., 2008), e o fucoidan da alga marrom *Fucus vesiculosus* apresentou cerca de 60% de sequestro de radicais hidroxila em uma concentração de 100 µg/mL (SOUZA et al., 2007).

A atividade anticoagulante é a mais bem caracterizada para os polissacarídeos de algas marinhas (ALBUQUERQUE et al., 2004; COSTA et al., 2010). Ela é mensurada, principalmente, através da utilização de “kits” comerciais de aPTT e PT que avaliam a via intrínseca e extrínseca da coagulação,

respectivamente. A análise da atividade anticoagulante das frações da CCM e CCB foi realizada por esses dois testes. Curiosamente, apesar da CCM F1.0 e CCB F1.0 mostrarem a mesma razão sulfato/açúcar, a atividade da CCB F1.0 (33 µg/mL) no teste aPTT foi o dobro da sua correlata, ao passo que as frações CCM F0.3 e F0.5 não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$) nas suas atividades quando comparadas com suas correlatas da CCB. Este resultado é interessante, considerando que as correlatas F1.0 apresentaram características estruturais semelhantes. Vários estudos relatam que a proporção e/ou distribuição do sulfato ao longo da cadeia de polissacarídeos pode ser um motivo estrutural crítico para promover a interação dos polissacarídeos sulfatados com os inibidores da coagulação e suas proteases alvo (ROCHA et al., 2006; POMIN; MOURÃO, 2008), como observado para polissacarídeos sulfatados das algas vermelhas *Gelidium crinale* e *Botryocladia occidentalis*. Estes polímeros têm uma estrutura sacarídica idêntica e o mesmo tamanho da cadeia, mas com pequenas diferenças em seus padrões de sulfatação. Como consequência dessas diferenças, o polissacarídeo de *G. crinale* apresenta efeitos pró-coagulante e pró-trombótico em baixas doses, enquanto, o polissacarídeo de *B. occidentalis* é um composto anticoagulante e antitrombótico muito potente em baixas doses (FONSECA et al., 2008). Em trabalhos futuros, os polissacarídeos da CCM F1.0 e CCB F1.0 serão submetidos a análises estruturais para identificar as pequenas diferenças em seus padrões de sulfatação. Além disso, observou-se que a atividade no teste de aPTT das frações F0.3 e F0.5 foram semelhantes a atividade da Clexane®, um medicamento anticoagulante utilizado como controle positivo. Isto sugere que os polissacarídeos sulfatados de *C. cupressoides* podem ser utilizados na terapêutica anticoagulante.

Surpreendentemente, no teste PT, as frações polissacarídicas F0.3 e F0.5 apresentaram atividade anticoagulante. Este é o primeiro relato de polissacarídeos sulfatados de algas verdes tropicais com elevada atividade anticoagulante no teste PT. A única diferença significativa ($p < 0,001$) observada foi entre a atividade da CCM F0.5 e CCB F0.5. Em concentrações mais elevadas, CCB F0.5 foi mais potente que a CCM F0.5. Neste resultado, encontrou-se uma relação positiva entre a atividade biológica e a quantidade de sulfato dos polissacarídeos sulfatados de *C. cupressoides*.

Foi observado uma elevada prolongação no tempo de coagulação pelos polissacarídeos sulfatados da *C. cupressoides* para o teste de aPTT, já para o teste de PT a prolongação do tempo de coagulação não foi tão pronunciada, o que pode sugerir que os polissacarídeos sulfatados aqui estudados não inibem diretamente a trombina ou interferem com a clivagem do fibrinogênio, assim como do fator V. Provavelmente, os polissacarídeos agem desestabilizando os componentes dos complexos tenases, ou ainda, preferencialmente potencializando a inibição das proteases pela AT, uma vez que esta age sobre proteases da via intrínseca. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar estas sugestões.

Até o momento só há trabalhos que mostram que a quantidade e qualidade de carboidratos pode ser afetada pela salinidade, no entanto, não há relatos de como as enzimas de síntese e degradação, por exemplo sulfotransferases e glicosidases, poderiam ser afetadas por esse parâmetro abiótico, e assim resultar em diferenças nas estruturas de polissacarídeos sulfatados. Provavelmente, as enzimas envolvidas no metabolismo de polissacarídeos estão sendo afetadas pela a salinidade e acredita-se que no futuro, surgirão dados sobre este respeito.

Embora a salinidade não tenha induzido qualquer diferença significativa nas características estruturais dos polissacarídeos de *C. cupressoides*, como observado por análises de espectroscopia de infravermelho e eletroforese em gel de agarose, supõe-se que pequenas diferenças na posição de substituição do grupo sulfato ao longo de cada cadeia dos polissacarídeos possam ser induzidas por uma mudança na salinidade. Provavelmente, este parâmetro ambiental possa modificar o metabolismo de algas, induzindo a síntese de polissacarídeos sulfatados com ligeiras diferenças químicas na estrutura, que resultariam consequentemente em diferentes atividades biológicas. Elucidar os mecanismos que produzem polissacarídeos sulfatados e sua relação com a salinidade da água do mar pode ajudar no desenvolvimento de novos medicamentos a partir de algas e seus polissacarídeos.

5 CONCLUSÕES

- Ao contrário de outras algas, a composição centesimal da *Caulerpa cupressoides* não se alterou com o aumento da salinidade da água do mar.

- Não houve diferença significativa entre o rendimento das frações polissacarídicas da CCM e de suas correlatas na CCB, o que indica que a salinidade também não interfere no rendimento das frações polissacarídicas.

- Apenas a razão sulfato/açúcar de F0.3 e F0.5 mudou com o nível de salinidade, CCM F0.3 e CCB F0.5 tiveram maior razão sulfato/açúcar que suas correlatas, já para F1.0 e F2.0 não houve diferença significativa entre CCM e CCB, sugerindo que a diferença observada na razão sulfato/açúcar entre as frações, não é meramente função da salinidade, mas, provavelmente, também está relacionada com a função biológica destes biopolímeros na alga.

- A composição monossacarídica, massa molecular, perfil eletroforético e espectros de infravermelho das frações de polissacarídeos sulfatados da CCM foram similares aos de suas correlatas na CCB, o que indica que a salinidade da água do mar não afeta estes parâmetros presentes nos polissacarídeos sulfatados da *C. cupressoides*.

- Houve diferenças significativas entre as atividades antioxidantes e anticoagulantes de algumas frações polissacarídicas da CCM e suas correlatas em CCB. O que sugere que a salinidade da água do mar possa ter criado sutis diferenças na estrutura dos polissacarídeos sulfatados, como por exemplo, a distribuição dos grupos sulfatos, o que ocasionaria as diferenças nas atividades biológicas entre as frações da CCM e da CCB.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. L. C.; BIRD, R. J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology (Carlton)**, Australia, v. 14, n. 5, p. 462-470, 2009.

ALBUQUERQUE, I. R. et al. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Braz J Med Biol Res**, Brazil, v. 37, n. 2, p. 167-171, 2004.

ALBUQUERQUE, I. R. L. **Purificação e caracterização parcial de uma fucana C de *Dictyota menstrualis* e estudo do seu efeito antiinflamatório e nociceptivo.** 2005. 93f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, 2005.

ALVES, L. G. **Polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha *Sargassum vulgare*.** 2000. 86f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, 2000.

ANANTHI, S. et al. In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). **Food Chem Toxicol**, England, v. 48, n. 1, p. 187-192, 2010.

ANDRADE JÚNIOR, D. R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J Bras Pneumol**, Brazil, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.

AQUINO, R. S. et al. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, England, v. 15, n. 1, p. 11-20, 2005.

ATHUKORALA, Y. et al. Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Bioresour Technol**, England, v. 98, n. 9, p. 1711-1716, 2007.

ATHUKORALA, Y.; KIM, K. N.; JEON, Y. J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food Chem Toxicol**, England, v. 44, n. 7, p. 1065-1074, 2006.

AZEVEDO, T. C. et al. Heparinoids algal and their anticoagulant, hemorrhagic activities and platelet aggregation. **Biomed Pharmacother**, France, v. 63, n. 7, p. 477-483, 2009.

AZEVEDO, T. C. G. **Ação de Polissacarídeos sulfatados de *Fucus vesiculosus* na hemostasia e no sistema complemento**. 2006. 122f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, 2006.

BANERJEE, A.; DASGUPTAN, N.; DE, B. *In vitro* study of antioxidant activity as *Syzygium cumini* fruit. **Food Chem**, England, v. 90, n. 4, p. 727-733, 2005.

BANERJEE, K. et al. Seasonal variation in the biochemical composition of red seaweed (*Catenella repens*) from Gangetic delta, northeast coast of India. **J Earth Syst Sci**, India, v. 118, n. 5, p. 497-505, 2009.

BARROSO, E. M. A et al. A non-anticoagulant heterofucan has antithrombotic activity in vivo. **Planta Med**, Germany, v. 74, n. 7, p. 712-718, 2008.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem**, United States, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BLIGH, E. C.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**, Canada, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

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**, United States, v. 115, p. 149-154, 1936.

CHO, S. H. et al. The Antioxidant Properties of Brown Seaweed (*Sargassum siliquastrum*) Extracts. **J Med Food**, United States, v. 10, n. 3, p. 479-485, 2007.

CIANCIA, M. et al. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. **Int J Biol Macromol**, Netherlands, v. 41, n. 5, p. 641-649, 2007.

CINELLI, L. P. et al. Expression of two different sulfated fucans by females of *Lytechinus variegatus* may regulate the seasonal variation in the fertilization of the sea urchin. **Glycobiology**, England, v. 17, n. 8, p. 877-885, 2007.

CONHEÇA MACAU. Disponível em:<<http://www.macau.com.br/>>. Acesso em: 25 mar 2010.

COSTA, L. S. **Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga vermelha *Gracilaria caudata***. 2008. 74f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, 2008.

COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomed Pharmacother**, France, v. 64, n. 1, p. 21-28, 2010

DASGUPTA, N.; DE, B. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. **Food Chem**, England, v. 101, n. 2, p. 471-474, 2007.

DEACON-SMITH, R. A.; LEE-POTTER, J. P.; ROGERS, D. J. Anticoagulant. activity in extracts of British marine algae. **Bot mar**, Berlin, v. 28, n. 8, p. 333-338. 1985.

DECKER, E. A.; WELCH, B. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food?. **J Agric Food Chem**, United States, v. 38, n.3, p. 4, 1990.

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

DIETRICH, C.P. et al. A new approach for characterization of polysaccharides from algae: presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. 1995. **Plant Sci**, Ireland, v. 108, n.2, p. 143-153, 1995.

DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. **J Biol Chem**, United States, v. 167, n. 1, p. 189-198, 1946.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem J**, England, v. 84, n. 1, p. 106-110, 1962.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Anal Chem**, United States, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EARDLEY, D. D. et al. Monoclonal antibodies specific for sulfated polysaccharides on the surface of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae). **J Phycol**, United States, v. 26, n. 1, p. 54-62, 1990.

ESTEVEZ, J.M. et al. Chemical and in situ characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*. **Glycobiology**, England, v. 19, n. 3, p. 212-28, 2009.

FABRIS, F. et al. Heparin-induced thrombocytopenia. **Haematologica**, Italy, v. 85, p. 72-81, 2000.

FARIAS, E. H. C. **Análise comparativa da atividade anticoagulante de frações de polissacarídeos sulfatados das algas marinhas *Caulerpa prolifera* e *Codium isthmocladum***. 2005. 44f. Graduação em Ciências Biológicas (Monografia). Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, 2005.

FARIAS, E. H. C. **Homogalactanas sulfatadas da alga *Codium isthmocladum* com atividade anticoagulante**. 2006. 74f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em bioquímica. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, 2006.

FARIAS, E. H. et al. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. **Glycobiology**, England, v. 18, n. 3, p. 250-259, 2008.

FARIAS, W. R. L. et al. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. **J Biol Chem**, United States, v. 275, n. 38, p. 29299–29307, 2000.

FARNDAL, R.W.; BUTTLE, D. J.; BARRET, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochim Biophys Acta**, Netherlands, v. 883, n. 2, p. 173-177, 1986.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, Brazil, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLEURENCE, J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. **Trends Food Sci Technol**, England, v. 10, n. 1, p. 25-28, 1999.

FONSECA, P. C. **Composição química e variação sazonal da biomassa de *Sargassum vulgare* C. Agardh e *Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh, na praia de Búzios, Rio Grande do Norte**. 2001. 63f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Bioecologia Aquática. Departamento de Oceanografia e Limnologia - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. UFRN, Natal, 2001.

FONSECA, R. J. et al. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thromb Haemost**, Germany, v. 99, n. 3, p. 539-545, 2008.

FOSTER, G. G.; HODGSON, A. N. Consumption and apparent dry matter digestibility of six intertidal macroalgae by *Turbo sarmaticus* (Mollusca: Vetigastropoda: Turbinidae). **Aquaculture**. Netherlands, v. 167, n. 3-4, p. 211-227, 1998.

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

GANESAN, P.; KUMAR, C. S.; BHASKAR, N. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected indian red seaweeds. **Bioresour Technol**, England, v. 99, n. 8, p. 2717-2723, 2008.

GHOSH, P. et al. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, United States, v. 65, n. 23, p. 3151-3157, 2004.

GRÜNEWALD, N.; GROTH, I.; ALBAN, S. Evaluation of seasonal variations of the structure and anti-inflammatory activity of sulfated polysaccharides extracted from the red alga *Delesseria sanguinea* (Hudson) Lamouroux (Ceramiales, Delesseriaceae). **Biomacromolecules**, United States, v. 10, n. 5, p. 1155–1162, 2009.

GUILLOIN, F. et al. Generation of polyclonal and monoclonal antibodies against arabinoxylans and their use for immunocytochemical location of arabinoxylans in cell walls of endosperm of wheat . **J Cereal Sci**, England, v. 40, n. 2, p. 167-182, 2004.

-
- HARADA, N.; MAEDA, M. Chemical structure of antitrombin-active rhamnan sulfate from *Monostroma nitidum*. **Biosci Biotechnol Biochem**, Japan, v. 62, n. 9, p. 1647-1652, 1998.
- HAROUN-BOUHEDJA, F. et al. Relation between sulfate groups and biological activities of fucans. **Thromb Res**, United States, v. 100, n. 5, p. 453-459, 2000.
- HAYAKAWA, Y. et al. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Biochim Biophys Acta**, Netherland, v. 1543, n. 1, p. 86-94, 2000.
- HONYA, M. et al. Monthly changes in the content of fucans, their constituent sugars and sulphate in cultured *Laminaria japonica*. **Hydrobiologia**, Netherlands, v. 398/399, n. 0, p. 411-416, 1999.
- HOYER, K.; KARSTEN, U.; WIENCKE, C. Induction of sunscreen compounds in Antarctic macroalgae by different radiation conditions. **Mar Biol**, Germany, v. 141, n. 4, p. 619-627, 2002.
- HU, T. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida in vitro*. **Int J Biol Macromol**, Netherlands, v. 46, n. 2, p. 193-198, 2010.
- JURD, K. M. et al. Anticoagulant properties of sulfated polysaccharides and a proteoglycan from *Codium fragile* ssp. **J appl Phycol**, Netherlands, v. 7, n. 4, p. 339-345, 1995.
- KLOAREG, K.; QUATRANO, R. S. Cell walls of marine algae: structure and function. **Oceanog Mar Biol Annu Rev**, [S.l.], v. 26, p. 259-315, 1988.
- KUMAR, K. S.; GANESAN, K.; RAO, P. V. S. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. **Food Chem**, England, v. 107, n. 1, p. 289-295, 2008.
- LABTEST. Guia técnico de coagulação. 2009. Disponível em: <<http://www.labtest.com.br/download.php?a=5491>>. Acesso em: 25 mar 2010.
- LEE, J. B. et al. Rhamnan sulfate from cell walls of *Monostroma latissimum*. **Phytochemistry**, United States, v. 48, n. 6, p. 921-925, 1998.
- Mariana Santana S. P. da Costa
-

LENSEN, J. F. et al. Selection and characterization of a unique phage display-derived antibody against dermatan sulfate. **Matrix Biol**, Netherlands, v. 25, n. 7, p. 457-461, 2006.

LI, L. et al. A polysaccharide-peptide complex from abalone mushroom (*Pleurotus abalonus*) fruiting bodies increases activities and gene expression of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice. **Appl Microbiol Biotechnol**, Germany, v. 75, n. 4, p. 863-869, 2007.

LIM, B. L.; RYU, I. H. Purification, Structural Characterization, and Antioxidant Activity of Antioxidant Substance from the Red Seaweed *Gloiopeltis tenax*. **J Med Food**, United States, v. 12, n. 2, p. 442-51, 2009

MAEDA, M. et al. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their distribution in the Chlorophyta. **Phytochemistry**, United States, v. 30, n. 11, p. 3611-3614, 1991.

MANDAL, P. et al. Anti-herpetic activity of a sulfated xylomannan from *Scinaia hatei*. **Phytochemistry**, United States, v. 69, n. 11, p. 2193–2199, 2008.

MAO, W. et al. Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. **J Appl Phycol**, Netherlands, v. 18, n. 1, p. 9-14, 2006.

MAO, W. Heparinoid-active two sulfated polysaccharides isolated from marine green algae *Monostroma nitidum*. **Carbohydr Polym**, England, v. 74, n. 4, p. 834-839, 2008.

MAO, W. et al. Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta). **Int J Biol Macromol**, Netherlands, v. 44, n. 1, p. 70-74, 2009.

MARINHO-SORIANO, E. et al. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. **Bioresour Technol**, England, v. 97, n. 18, p. 2402-2406, 2006.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Effects of season on the yield and quality of Agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresour Technol**, England, v. 90, n. 3, p. 329-333, 2003.

-
- MARQUES, C. T. **Caracterização estrutural e ação de fucanas de *Padina gymnospora* no processo inflamatório**. 2007. 74f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, 2007.
- MATSUBARA, K. et al. An anticoagulant proteoglycan from the marine green alga, *Codium pugniformis*. **J Appl Phycol**, Netherlands, v. 12, n. 1, p. 9-14, 2000.
- MATSUBARA, K. et al. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. **Int J Biol Macromol**, Netherlands, v. 28, n. 5, p. 395-399, 2001.
- MATSUKAWA, R. et al. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **J Appl Phycol**, Netherlands, v. 9, n. 1, p. 29-35, 1997.
- MEDEIROS, V. P. et al. Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties. **Biochemistry (Mosc)**, United States, v. 73, n.9, p. 1018-1024, 2008.
- MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem J**, England, v. 218, n. 1, p. 273-275, 1984.
- MINHAS, K. S. et al. Flow behavior characteristics of ice cream mix made with buffalo milk and various stabilizers. **Plant Foods Hum Nutr**, Netherlands, v. 57, n. 1, p. 25-40, 2002.
- NADER, et al. Physico-chemical characteristics of heparin in relation to its anticoagulant and anti-hemostatic action. **Rev Bras Biol**, Brazil, v. 39, n. 4, p.793-816, 1979.
- NADER, H. B. et al. A correlation between the sulfated glycosaminoglycan concentration and degree of salinity of the "habitat" in fifteen species of the classes Crustacea, Pelecypoda and Gastropoda. **Comp Biochem Physiol**, England, v.76B, p. 433-436, 1983.
- NADER, H. B. et al. Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Curr Pharm Des**, Netherlands, v. 10, n. 9, p. 951-966, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NG, T. B. et al. Rose (*Rosa rugosa*)-flower extract increases the activities of antioxidant enzymes and their gene expression and reduces lipid peroxidation. **Biochem Cell Biol.** v. 83, p. 78-85, 2005.

PAIVA, P. M. G. **Influência da variação sazonal na composição química de cinco espécies de algas marinhas do litoral do Rio Grande do Norte**. 1984. 46f. Graduação em Ciências Biológicas (Monografia). Departamento de Fisiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, Natal, 1984.

PERCIVAL, E. G. V.; McDOWELL, R. H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. London: Academic Press. 1967.

PERFETO, P. N. M. Relation between chemical composition of *Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe, *Gymnogongrus griffithsiae* (Turner) Martius, and abiotic parameter. **Acta bot Bras**, Brazil, v. 12, n. 1, p. 77-88, 1998.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, England, v. 18, n. 12, p. 1016-1027, 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**, United States, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

QI, H. et al. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. **Int J Biol Macromol**, Netherlands, v. 37, n. 4, p. 195-199, 2005a.

QI, H. et al. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). **J Appl Phycol**, Netherlands, v. 17, n. 6, p. 527-534, 2005b.

QI, H. et al. In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Bioorg Med Chem Lett**, England, v. 16, n. 9, p. 2441-2445, 2006.

QUILLET, M. The chemical composition of brown algae I. The non esterified sugars. **Colloq Natx Cent Natl Rech Sci**, France, v.103, p. 145-156, 1961.

RATANA-ARPORN, P.; CHIRAPART, A. Nutritional evaluation of tropical green seaweeds *Caulerpa lentillifera* and *Ulva reticulata*. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, Thailand, v. 40, p. 75-83, 2006.

RIDELL, J. P. Jr. Theories of blood coagulation. **J Pediatr Oncol Nurs**, United States, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2007.

RIOUX, L. E.; TURGEON, S. L.; BEAULIEU, M. Effect of season on the composition of bioactive polysaccharides from the brown seaweed *Saccharina longicuris*. **Phytochemistry**, United States, v. 70, n. 8, p. 1069-75, 2009.

ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Chemical and mineral composition of six potentially edible seaweed species of Yucata ´n. **Botanica Marina**, Germany, v. 40, n. 1-6, p. 301–306, 1997.

ROCHA, F. D. et al. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Rev Bras de Farmacogn**, Brazil, v. 17, n. 4, p. 631-639, 2007.

ROCHA, H. A. O. **Extração e purificação de uma fucana da alga marinha *Spatoglossum schröderi***. 1998. 85f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 1998.

ROCHA, H. A. O. et al. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent? **J Biol Chem**, United States, v. 280, n. 50, p. 41278-41288, 2005a.

ROCHA, H. A. O. et al. A xylogalactofucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* stimulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial cells. **Planta Med**, Germany, v. 71, n. 4, p. 379-381, 2005b.

ROCHA, H. A. O. et al. 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. 51-67.

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

SANTOS, N. D. **Identificação e caracterização química das frações ricas em polissacarídeos sulfatados extraídos de macrófitas dulcícolas**. 2007. 93f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal, 2007.

SHANMUGAM, M.; MODY, K. H. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. **Curr Sci**, India, v. 79, n. 12, p. 1672-1683, 2000.

SHANMUGAN, M. et al. Blood anticoagulant of a green marine alga *Codium dwarkense* (Codiaceae, Chlorophyta) in relation to its growth stages. **Indian J Mar Sci**, India, v. 30, p. 49-52, 2001.

SHANMUGAN, M. et al. Screening of Codiacean algae (Chlorophyta) of the Indian coasts for blood anticoagulant activity. **Indian J Mar Sci**, India, v. 31, n. 1, p. 33-38, 2002.

SHASHOUA, V. E. et al. New synthetic peptides can enhance gene expression of key antioxidant defense enzymes in vitro and in vivo. **Brain Res**, Netherlands, v. 1024, n. 1-2, p. 34-43, 2004.

SHIBATA, H. et al. Anti-ulcer effect of fucoidan from brown seaweed *Cladosiphon okamuranus* tokida. **Jpn J Pharmacol**, Japan, v. 26, p. 1211-1215, 1998.

SIDDHANTA, A. K. et al. Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. from the west coast of India: chemical composition and blood anticoagulant activity. **Int J Biol Macromol**, Netherlands, v. 26, n. 2-3, p. 151-154, 1999.

SILVA, F. R. F. et al. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydr Polym**, England, v. 79, n. 1, p. 26-23, 2010.

SILVA, T. M. et al. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Braz J Med Biol Res**, Brazil, v. 38, n. 4, p. 523-533, 2005.

SIMIC, M.G. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. **Mutat Res**, Netherlands, v. 202, n. 2, p. 377-386, 1988.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, United States, v. 28, p. 1057-1060, 1989.

SOEDA, S. et al. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. **Biochim Biophys Acta**, Netherlands, v. 1497, n. 1, p. 127-134, 2000.

SOMOGYI, A. et al. Antioxidant measurements. **Physiol Meas**, England, v. 28, p. R41-R55, 2007.

SOUZA, M. C. R. et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **J Appl Phycol**, Netherlands, v. 19, n. 2, p. 153-160, 2007.

SPECTOR, T. Refinement of the coomassie blue method of protein qualification. A simple and linear spectrophotometric assay for ≤ 0.5 to 50 μg of protein. **Anal Biochem**, United States, v. 86, p. 142-146, 1978.

TOJO, E; PRADO, J. Chemical composition of carrageenan blends determined by IR spectroscopy combined with a PLS multivariate calibration method. **Carbohydr Res**, Netherlands, v. 338, n. 12, p. 1309-1312, 2003.

UEHARA, T.; TAKESHITA, M.; MAEDA, M. Studies on anticoagulant-active arabinan sulfates from the green alga, *Codium latum*. **Carbohydr Res**, Netherlands, v. 235, p. 309-311, 1992.

WANG, J. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **Int J Biol Macromol**, England, v. 42, n. 2, p. 127-132, 2008.

WANG, J. et al. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. **Int J Biol Macromol**, England, v. 46, n. 1, p. 6-12, 2010.

WANG, J. et al. Synthesized different derivatives of low molecular fucoidan extracted from *Laminaria japonica* and their potential antioxidant activity in vitro. **Int J Biol Macromol**, England, v. 44, n. 5, p. 379-84, 2009a.

WANG, J. et al. Synthesized phosphorylated and aminated derivatives of fucoidan and their potential antioxidant activity in vitro. **Int J Biol Macromol**, England, v. 44, n. 2, p. 170-174, 2009b.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respir Physiol**, Netherlands, v. 128, n. 3, p. 379-391, 2001.

WONG, K. H.; CHEUNG, C. K. Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds: Part I — proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. **Food Chem**, England, v. 71, n. 4, p. 475-482, 2000.

XUE, C. H. et al. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. **J Appl Phycol**, Netherlands, v. 13, n. 1, p. 67-70, 2001.

YAN, X.; NAGATA, T.; FAN, X. Antioxidative activities in some common seaweeds. **Plant Foods Hum Nutr**, Netherlands, v. 52, n. 3, p. 253-262, 1998.

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

ZHANG, H. J. et al. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydr Polym**, England, v. 71, n. 3, p. 428-434, 2008.

ZHANG, Q. et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions *Porphyra haitanesis*. **J Appl Phycol**, Netherlands, v. 15, n. 4, p. 305-310, 2003.

ZHANG, Q. et al. Chemical characteristics of a polysaccharides from *Porphyra capensis* (Rhodophyta). **Carbohydr Res**, Netherlands, v. 340, n. 15, p. 2447-2450, 2005.

ZHANG, Q. et al. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity. **Carbohydr Res**, Netherlands, v. 339, n. 1, p. 105-111, 2004.

ZHANG, Z. et al. Preparation of the different derivatives of the low-molecular-weight porphyrin from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant activities *in vitro*. **Int J Biol Macromol**, Netherlands, v. 45, n. 1, p. 22-26, 2009.

ZHAO, T. et al. Degradation of porphyrin from *Porphyra haitanensis* and the antioxidant activities of the degraded porphyrins with different molecular weight. **Int J Biol Macromol**, Netherlands, v. 38, n. 1, p. 45-50, 2006.

ZHOU, J. et al. Preliminary studies on the chemical characterization and antioxidant properties of acidic polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. **J Zhejiang Univ Sci B**, China, v. 9, n. 9, p. 721-727, 2008.

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](#)